

# MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA LA DETERMINACIÓN DE LA SENSIBILIDAD A LOS ANTIMICROBIANOS EN BACTERIAS AISLADAS DE HUMANOS

*Ministerio de Salud*

Subsecretaría de Investigación y Tecnología  
ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán”  
INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS  
Departamento Bacteriología  
Servicio Antimicrobianos  
Buenos Aires, Argentina  
2001

## INDICE

METODO DE DETERMINACION DE SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA POR DIFUSION .....	3
1.0. INTRODUCCION .....	3
2.0. INDICACIONES PARA LA REALIZACION DE LOS TEST DE SUSCEPTIBILIDAD .....	4
3.0. SELECCION DE LOS AGENTES ANTIMICROBIANOS PARA LAS PRUEBAS DE SENSIBILIDAD .....	4
4.0. REACTIVOS PARA EL TEST DE DIFUSION POR DISCO .....	7
5.0. PROCEDIMIENTO para la realización del test de difusión por disco .....	9
6.0. Microorganismos Fastidiosos .....	11
7.0. DETERMINACION DE $\beta$ -LACTAMASAS .....	16
8.0. Interpretación de los resultados del método de difusión por disco .....	17
9.0. CONTROL DE CALIDAD .....	18
10. Limitaciones del metodo de difusión por discos .....	22
DETERMINACION DE LA SENSIBILIDAD .....	28
A LOS ANTIMICROBIANOS POR EL METODO DE DILUCION .....	28
1.0 INTRODUCCION .....	28
2.0 INDICACIONES PARA REALIZAR PRUEBAS DE SENSIBILIDAD .....	28
3.0. AGENTES ANTIMICROBIANOS .....	29
4.0. SELECCION DE LOS AGENTES ANTIMICROBIANOS PARA LAS PRUEBAS DE RUTINA E INFORME DE LOS RESULTADOS .....	31
5.0 PREPARACION DEL INOCULO PARA LAS PRUEBAS DE DILUCION .....	32
6.0 PROCEDIMIENTO PARA LA DILUCION EN AGAR .....	32
7.0 METODO DE DILUCION EN CALDO (MACRO Y MICRODILUCION) .....	35
8.0 MICROORGANISMOS CON EXIGENCIAS NUTRICIONALES ESPECIALES .....	39
9.0 MICROORGANISMOS PROBLEMA .....	40
10.0 DETERMINACION DE $\beta$ -LACTAMASAS .....	42
11.0 INFORME DE LOS RESULTADOS .....	43
12.0 PROCEDIMIENTOS PARA EL CONTROL DE CALIDAD .....	43
13. Limitaciones de los metodos de dilucion .....	49
14.0 PRUEBAS DE "SCREENING" .....	50
APENDICE A. DIAGRAMA DE FLUJO DE LOS PROTOCOLOS DE CONTROL DE CALIDAD ...	51
APENDICE A. (Continuación) .....	52
RESUMEN GENERAL DE RECOMENDACIONES DEL .....	55
NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (NCCLS) .....	55
Alejandra Corso .....	55
Streptococcus pneumoniae :	55
Streptococcus spp :	56
Haemophilus spp .....	57
N. meningitidis :	58
Staphylococcus spp .....	58
Enterococcus spp .....	59
Betalactamasas de Espectro Extendido (BLEE) en <i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> y <i>K.oxytoca</i> .....	60
Vibrio cholerae :	61
Morganella spp :	61
Providencia spp .....	61
Pseudomonas aeruginosa .....	61
Acinetobacter spp .....	62
Moraxella catarrhalis .....	62
Antimicrobianos con recomendaciones particulares .....	62
Mas cepas de referencia para Control de Calidad .....	63
Condiciones Metodológicas para la Detección y Confirmación de la Presencia de BLEE en <i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> y <i>K.oxytoca</i> .....	64
1) Método de difusión :	64
2) Método de Dilución .....	65
NOVEDADES DEL NCCLS 2001 .....	66

## METODO DE DETERMINACION DE SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA POR DIFUSION

### 1.0. INTRODUCCION

La técnica actualmente utilizada para la determinación de la sensibilidad a los antimicrobianos es el producto de importantes esfuerzos internacionales desde hace más de dos décadas enfocados a normatizar el método.

El comité de expertos de la OMS. y grupos colaborativos internacionales dirigidos por Ericsson y Sherris sugirieron recomendaciones que fueron seguidas por la mayor parte de los países europeos.

Sin embargo, la falta de un acuerdo general sobre los puntos de corte para la interpretación de estas pruebas continúan siendo un tema de importantes esfuerzos internacionales. Europa está dividida en varias regiones de influencia con diferentes sistemas de sensibilidad antimicrobiana : Grupo Sueco de Referencia en Antimicrobianos, el Sistema DIN, el de los países bajos, la Sociedad Británica de Antimicrobianos, la Sociedad Francesa de Microbiología y el Comité Americano de Estandarización de Laboratorios Clínicos (NCCLS).

En nuestro país y en la mayoría de los países latinoamericanos se siguen las pautas del NCCLS con algunas modificaciones.

El siguiente es un resumen de la metodología referida habitualmente como "Método de la OMS.", que no difiere substancialmente del conocido "Kirby-Bauer". Las tablas de interpretación fueron tomadas de las normas M2 – A7 del National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) de Enero de 2001.

El principio del método involucra el uso de una cantidad constante de antimicrobianos en un reservorio (discos de papel) aplicado sobre la superficie del agar en el cual se ha cultivado el microorganismo en cuestión. Se formará así por difusión, un gradiente de concentración del antimicrobiano y la sensibilidad del microorganismo estará indicada por el tamaño de la zona de inhibición del crecimiento alrededor del reservorio. El diámetro obtenido dependerá no solo de la sensibilidad del microorganismo y la carga del disco, sino también del espesor de la capa del agar, su pH y composición, de la capacidad de difusión de la droga en ese medio, la temperatura, la velocidad de duplicación bacteriana, y el tamaño y fase de crecimiento del inóculo.

Para que los resultados sean confiables los procedimientos deberán ser controlados y estandarizados cuidadosamente.

El método recomendado por la NCCLS (Subcommittee on Antimicrobial Susceptibility Testing) se basa en los estudios de Bauer y colaboradores (4). Este es el método descrito de manera más completa para el cual se han desarrollado tablas de interpretación que están respaldadas por datos clínicos y de laboratorio. El único método alternativo que ha sido estudiado adecuadamente y que demostró datos comparables de los diámetros de las zonas de inhibición, con precisión similar y correlación satisfactoria con la CIM, es la modificación de doble capa de Barry, García y Thrupp (5). Este método es una alternativa aceptable para la normalización del inóculo en las pruebas de sensibilidad de aislamientos de gérmenes patógenos de rápido crecimiento, como *S. aureus*, Enterobacterias y *P. aeruginosa*. El método de doble capa en agar no es aplicable a las pruebas con otros microorganismos tales como *Streptococcus* spp., *Haemophilus* spp., etc.

Las pruebas por cualquiera de los dos métodos pueden interpretarse con las mismas tablas de medida de los halos de inhibición si los resultados de las pruebas con las cepas controles se encuentran dentro de los rangos esperados.

## 2.0. INDICACIONES PARA LA REALIZACION DE LOS TEST DE SUSCEPTIBILIDAD

Las pruebas de sensibilidad están indicadas para cualquier microorganismo, contribuyendo así a orientar el tratamiento quimioterápico de los procesos infecciosos, si su sensibilidad no puede ser predicha a partir del conocimiento de la identidad del germen.

Frecuentemente están indicadas en caso que la especie en estudio sea capaz de mostrar resistencia a los antibióticos usados comúnmente.

Las pruebas de sensibilidad pueden ser necesarias cuando aún, conociéndose la sensibilidad del germen a drogas altamente efectivas, el paciente no puede recibir dicha medicación (por ejemplo: *S. pyogenes* en pacientes alérgicos a la penicilina, en este caso puede probarse su sensibilidad frente a eritromicina y otros macrólidos).

El antibiograma puede ser indicado con fines epidemiológicos de resistencia y en el estudio de nuevos antibióticos.

Las pruebas de sensibilidad se deben realizar a partir de una cepa aislada. Se debería evitar realizar el antibiograma en forma directa a partir del material clínico, excepto en las emergencias clínicas donde la coloración directa de GRAM sugiere naturaleza monobacteriana. En este caso, debe repetirse luego usando la metodología estandarizada.

## 3.0. SELECCION DE LOS AGENTES ANTIMICROBIANOS PARA LAS PRUEBAS DE SENSIBILIDAD

La selección de los agentes antimicrobianos apropiados para el test de difusión, es una decisión de cada laboratorio clínico en consulta con el cuerpo médico, el comité de farmacia y el comité de enfermedades infecciosas. Las Tabla 1 y 1A enumeran los agentes de eficacia clínica probada para el tratamiento de infecciones por microorganismos que muestran una respuesta aceptable con las pruebas in vitro.

Las consideraciones que se han considerado en la designación de un agente antimicrobiano a un grupo específico incluyen: eficacia clínica, prevalencia de resistencia, costo, indicaciones del FDA, recomendaciones consenso para drogas de primera elección y alternativos.

### 3.1. Informes de rutina

Para evitar una mala interpretación, el informe de rutina al médico, deberá incluir únicamente las drogas apropiadas al uso terapéutico como sugieren las Tabla 1 y 1A. Otras drogas inapropiadas para el uso terapéutico pueden ser probadas para proveer datos taxonómicos o información epidemiológica. Sin embargo, tales resultados deberán estar disponibles sólo para el laboratorio o para el comité de control de infecciones.

Para la realización de una adecuada prueba de sensibilidad, el número de agentes probados debe ser limitado. En general, deberá incluir sólo un representante de cada grupo de drogas relacionadas con actividad casi idéntica y para las cuales la interpretación podría ser la misma.

### 3.2. Nombre genérico

Para minimizar confusiones, todos los antibióticos deberán ser referidos por su nombre genérico.

#### 3.2.1. $\beta$ -Lactámicos

Los antibióticos  $\beta$ -lactámicos poseen un anillo central de cuatro átomos denominado anillo  $\beta$ -lactámico. Su principal modo de acción es la inhibición de la síntesis de pared celular. El agregado de grupos sustituyentes al anillo  $\beta$ -Lactámico u otras estructuras cíclicas adicionales determinan si el agente es una penicilina, un cephem, un carbapenem o un monobactam.

### 3.2.1.1 **Penicilinas**

El espectro de las penicilinas está dirigido a bacterias no productoras de  $\beta$ -Lactamasas: gram positivas, algunos fastidiosos y gram negativos. Las acilamino-penicilinas (ampicilina y amoxicilina) poseen actividad contra muchas especies gram negativas, incluyendo miembros de la familia Enterobacteriaceae no productoras de  $\beta$ -lactamasas. Las carboxi-penicilinas (carbenicilina y ticarcilina) y las ureido-penicilinas (mezlocilina y piperacilina) poseen un amplio espectro contra gram negativos incluyendo algunas especies de Pseudomonas. Las penicilinas resistentes a las penicilinasas (cloxacilina, dicloxacilina, meticilina, nafcilina y oxacilina) poseen actividad contra gram positivos, inclusive los Staphylococcus productores de penicilinasas.

### 3.2.1.2. **Combinación de $\beta$ -Lactámico / inhibidor de $\beta$ -Lactamasas**

Esta combinación antimicrobiana incluye a una penicilina y un segundo agente que posee una actividad antibacteriana mínima pero funciona como inhibidor de algunas  $\beta$ -lactamasas.

### 3.2.1.3. **Cefalosporinas y otros Cephems**

Las distintas cefalosporinas y cephems frecuentemente poseen un espectro de actividad levemente diferente contra bacterias gram positivas y gram negativas. Estos agentes son frecuentemente referidos como cefalosporinas de "primera", "segunda" o "tercera" generación, dependiendo en gran parte de su actividad frente a bacterias gram negativas con alto grado de resistencia. Debido a las diferencias de actividad de algunos miembros de este grupo, deberían seleccionarse representantes de cada grupo para los test de rutina.

### 3.2.1.4. **Carbapenemes**

La estructura de los carbapenemes difiere levemente de la estructura de la penicilinas y son mucho más resistentes a la hidrólisis por las  $\beta$ -lactamasas. Esta característica les provee un amplio espectro de actividad contra muchas bacterias gram negativas y gram positivas.

### 3.2.1.5 **Monobactames**

Los monobactames son estructuralmente los únicos antibióticos que muestran actividad sólo contra bacterias gram negativas aeróbicas. Hasta el momento, el aztreonam es el único monobactam aprobado para su uso por el USFDA.

## 3.2.2. **Glicopéptidos**

Los glicopéptidos poseen una compleja estructura química y actúan inhibiendo la síntesis de pared celular en un sitio diferente al de los  $\beta$ -Lactámicos. La actividad de este grupo está dirigida a las bacterias gram positivas. La vancomicina es aceptada para el tratamiento de infecciones por bacterias gram positivas en pacientes alérgicos a la penicilina y también es útil para la terapia de infecciones debidas a especies bacterianas resistentes a  $\beta$ -Lactámicos, pe: *Staphylococcus aureus* meticilino resistentes (MRSA) y algunos enterococos.

## 3.2.3. **Aminoglucósidos**

Son un grupo de antibióticos de estructura similar que inhiben la síntesis de proteínas a nivel ribosomal. el espectro de actividad de los miembros de este grupo, está determinado por la existencia de enzimas bacterianas inactivantes de aminoglucósidos. Pueden utilizarse para el tratamiento de infecciones causadas por bacilos gram negativos aeróbicos o en combinaciones sinérgicas (con antibióticos inhibidores de la síntesis de pared celular) contra algunas bacterias gram positivas resistentes, pe. enterococos.

#### **3.2.4. Macrólidos**

Los macrólidos son antibióticos estructuralmente relacionados que inhiben la síntesis proteica a nivel ribosomal. Hay varios miembros de este grupo disponibles en el mercado que podrían ser considerados para ensayar en bacterias gram positivas o en algunos gram negativos fastidiosos.

#### **3.2.5. Tetraciclinas**

Las tetraciclinas inhiben la síntesis de proteínas a nivel ribosomal, de ciertas bacterias gram positivas y negativas. Las drogas de este grupo están relacionadas y salvo escasas excepciones, sólo la tetraciclina debería ser ensayada de rutina.

#### **3.2.6. Quinolonas**

Este grupo de compuestos incluye un número de agentes antimicrobianos íntimamente relacionados que funcionan primariamente inhibiendo la actividad de la DNA-girasa de muchas bacterias gram positivas y negativas. Diferencias sutiles en sus espectros de actividad, pueden requerir que se las ensayen como agentes individuales.

#### **3.2.7. Sulfonamidas y Trimetoprima**

Este grupo de compuestos, abarcan varios agentes quimioterapéuticos con similar espectro de actividad, los cuales inhiben el metabolismo del folato. El sulfisoxazol es la sulfonamida más comúnmente usada para el tratamiento de infecciones del tracto urinario y por lo tanto podría ser apropiada su selección para un test in-vitro. El sulfametoxazol es usualmente ensayado en combinación con trimetoprima, estos producen una inhibición secuencial en dos pasos del metabolismo del folato de algunas bacterias gram positivas y negativas.

#### **3.2.8. Clases de antibióticos con una única droga**

Cloranfenicol, clindamicina y rifampicina son antibióticos que inhiben la síntesis de proteínas. No presentan otros compuestos relacionados y deben ensayarse en los test in-vitro. La nitrofurantoina actúa inhibiendo varios pasos en la síntesis proteica. Esta última es útil solamente para infecciones en el tracto urinario, dado que su concentración en otros fluidos es extremadamente baja.

### **3.3. Guía para la selección de antimicrobianos**

Como se ve en la Tabla 1 y 1A los agentes del Grupo A se consideran apropiados para los test de rutina.

El Grupo B comprende agentes que son de importancia clínica particularmente para infecciones hospitalarias, y se deberán incluir en un test primario. Sin embargo, ellos deben ser informados selectivamente en el caso en que el microorganismo en estudio sea resistente a los agentes de la misma familia de Grupo A . Otro ejemplo en donde debe informarse la sensibilidad a los agentes de este grupo, sería cuando el foco de infección lo justifique (por ejemplo: trimetoprima-sulfametoxazol para aislamientos del tracto urinario o una cefalosporina de tercera generación para bacilos gram negativos). También deberán informarse en caso de alergia, infecciones polimicrobianas, infecciones que involucren múltiples sitios del organismo, intolerancia, falla de respuesta a los antibióticos del Grupo A o como ayuda epidemiológica en el control de infecciones.

El Grupo C está compuesto por agentes antimicrobianos alternativos o suplementarios que deben ser testeados en el caso de instituciones que presenten cepas endémicas o epidémicas resistentes a varias de las drogas primarias (especialmente en la misma familia, por ejemplo betalactámicos, aminoglucósidos), para el tratamiento de pacientes alérgicos a las drogas primarias, así como también para el tratamiento de microorganismos inusuales (por ejemplo:

cloranfenicol para aislamientos extraintestinales de *Salmonella* spp. o algún enterococo con resistencia a vancomicina) o como ayuda epidemiológica en el control de infecciones.

El Grupo U (“Orina”) enumera ciertos antimicrobianos, cuyo uso se limita a las infecciones del tracto urinario (p. ej. nitrofuranos y ciertas quinolonas). Estos agentes no se deben informar en caso de infecciones que se encuentren en otra localización que no sea la vía urinaria.

El Grupo O (“Otros”) incluyen antibióticos que poseen indicación clínica para un grupo de organismos determinado, pero en general no son candidatos para las pruebas de rutina e informe en los Estados Unidos.

El Grupo Inv. (“Investigación”) incluye agentes que están bajo investigación y aún no han sido aprobados por el FDA.

Informe Selectivo: Cada laboratorio debería elegir los agentes listados en las Tablas 1 y 1A para el informe de rutina (Grupo A) y aquellos que podría informar solo selectivamente (Grupo B), en consulta con la farmacia, el comité de terapéutica y control de infecciones y el plantel médico del hospital. El informe selectivo debería ayudar a mejorar la relevancia clínica y minimizar la selección de cepas multirresistentes nosocomiales por abuso de antibióticos de amplio espectro. Los resultados del Grupo B deberían informarse solo a pedido, o para algún microorganismo seleccionado. Resistencias inusuales deben ser informadas. Las resistencias inusuales deben informarse siempre que sean confirmadas.

#### 4.0. REACTIVOS PARA EL TEST DE DIFUSION POR DISCO

##### 4.1. Agar Mueller-Hinton

De los medios disponibles se considera al agar M-Hinton el mejor para las pruebas de sensibilidad de rutina dado que:

- Muestra buena reproducibilidad lote a lote en las pruebas de sensibilidad
- Contiene bajo nivel de inhibidores de sulfonamidas, trimetoprima y tetraciclina.
- Es adecuado para el desarrollo de la mayoría de las bacterias patógenas.
- Existen suficientes datos recopilados que avalan la experiencia de las pruebas de sensibilidad realizadas en este medio.

Aunque el agar M. Hinton es generalmente confiable para las pruebas de sensibilidad, los resultados obtenidos con algunos lotes pueden, en ocasiones, variar significativamente. Si un lote de medio no sustenta el adecuado crecimiento de los microorganismos probados, los halos obtenidos en las pruebas por difusión podrían ser mayores quedando fuera de los límites de control de calidad, conduciendo a resultados erróneos.

##### 4.1.1. Preparación del agar Mueller Hinton

- (1) Prepare el agar M. Hinton a partir de la base deshidratada de acuerdo a las recomendaciones del fabricante.
- (2) Inmediatamente después de esterilizar haga enfriar en baño de agua hasta 45-50°C.
- (3) Ponga el medio en las placas de Petri hasta un nivel aproximado de 4 mm. Esto corresponde a 60 - 70 ml de medio para placas de 150 mm. de diámetro y 25 a 30 ml. para las de 100 mm. de diámetro interno.
- (4) Las placas que no se usan en el día pueden mantenerse en refrigerador (2-8 °C.).
- (5) Las placas con más de 7 días de preparación no son adecuadas para las pruebas de sensibilidad salvo que sean envueltas en bolsas de plástico para evitar la desecación, de lo contrario deberán controlarse con los microorganismos de referencia, como se especifica en la sección 9.2.
- (6) Debe controlarse la esterilidad de cada lote incubando 24 horas o mas a 30-35 °C. Luego descarte esas muestras.

#### 4.1.2. pH

El pH para cada lote debe ser controlado cuando se prepara el medio. El agar debe tener un pH 7,2 - 7,4 a temperatura ambiente y debe determinarse después de su solidificación. Si el pH es demasiado bajo, ciertas drogas (pej. Aminoglucósidos, quinolonas y macrólidos) parecerán menos activas; mientras otras (pej. tetraciclinas) parecerán tener mayor actividad. Si el pH es demasiado alto se podrían esperar los efectos opuestos.

#### 4.1.3. Humedad

Si justo antes de usar, hay exceso de humedad en la superficie, las placas deben ser incubadas a 35°C durante 10 - 30 min. Las placas deberán estar húmedas pero no mostrar gotas sobre la superficie del medio.

#### 4.1.4. Efecto de la Timina o Timidina

Los medios que contienen excesiva cantidad de timina o timidina pueden revertir los efectos inhibitorios de las sulfonamidas y trimetoprima, produciendo así zonas más pequeñas, menos nítidas o sin halo lo cual puede dar como resultado un informe de falsa resistencia.

El agregado de timidina fosforilasa o sangre lisada de caballo puede mejorar la nitidez de los halos y la confiabilidad de las pruebas para sulfonamidas y trimetoprima frente a patógenos comunes, excepto para enterococos. Para evaluar cada lote de Mueller Hinton en su contenido de Timidina se debe utilizar una cepa control (*Enterococcus faecalis* ATCC® 29212 o ATCC® 33186) que se prueba frente a discos de trimetoprima / sulfametoxazol.

Un medio satisfactorio mostrará un halo de inhibición claro y definido de 20 mm o más.

#### 4.1.5. Efectos por variación en la composición de cationes divalentes

La variación en cationes divalentes principalmente Ca<sup>++</sup> y Mg<sup>++</sup> afectarán los resultados con tetraciclina, colistín y aminoglucósidos frente a *Ps. aeruginosa*. Un excesivo contenido de cationes reducirá la zona de inhibición, mientras que bajas concentraciones de cationes resultarán en zonas de inhibición mayores que las esperadas. Un exceso de zinc podría reducir las zonas de inhibición de los carbapenems.

Las pruebas realizadas con cada lote de agar M. Hinton deben estar de acuerdo con los límites de control de la Tabla 3. Los resultados de las pruebas con las cepas patrones deben ser cuidadosamente observados para detectar cualquier valor aberrante debido a la composición de cationes del medio de cultivo.

#### 4.1.6. Cepas con dificultades de crecimiento

Solo bacterias aeróbicas o facultativas que crecen satisfactoriamente en agar M. Hinton sin suplementar podrían ser testeadas en este medio. Para los test con cepas que no crecen satisfactoriamente en M. Hinton no suplementado (pej. *S. pneumoniae*, estreptococos B-hemolíticos y viridans), se adiciona sangre de oveja defibrinada al medio fundido y enfriado, en una concentración final de 5 % (V/V). Cuando la sangre se agrega al agar M. Hinton, los límites del control de oxacilina y meticilina serán levemente menores (2-3 mm.) a aquellos obtenidos con MH no suplementado. Esto podría resultar en zonas de inhibición menores a los límites aceptables con *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923 definidos en la Tablas 3. El agregado de sangre de carnero puede causar una fina película de crecimiento del microorganismo dentro de la zona de inhibición alrededor de los discos de sulfonamidas y trimetoprima. El agar chocolate no debe usarse para las pruebas con *Haemophilus* spp. El medio apropiado para este microorganismo es el descrito en la sección 6.1. Para *N. gonorrhoeae* ver sección 6.2.

## 4.2. Almacenamiento de los discos de ATB

Los discos de ATB deberán ser almacenados de la siguiente manera :

- Mantenerlos refrigerados a 8 °C o en freezer a -14 °C o menos, para mantener la droga en condiciones óptimas .
- Los discos que contienen drogas de la familia de antibióticos betalactámicos deben mantenerse en freezer para mantener su potencia. Los de pequeños stocks pueden mantenerse en el refrigerador.
- Los discos deben ser sacados del refrigerador o freezer 1 ó 2 horas antes de su uso a fin de lograr un equilibrio en la temperatura antes de ser abiertos los frascos. Este proceso evita la condensación que podría ocurrir cuando la humedad ambiente alcanza los frascos fríos.
- Cuando el indicador del desecador usado cambia de color debe interpretarse como un exceso de humedad y reemplazarse.
- Use solo los discos que no han sido calificados por sus fabricantes como vencidos.

## 4.3. Turbidez estándar para la preparación del inóculo

Para estandarizar la densidad del inóculo se usa una suspensión de sulfato de bario como estándar de turbidez (0.5 de la escala de Mc Farland).

- (a) Para prepararlo proceda de la siguiente manera:
- (b) Prepare dicho estándar agregando 0,5 ml de  $\text{BaCl}_2$  0,048M (1,175% P/V  $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) a 99,5 ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,18 M (0,36 N) (1% V/V).
- (c) Verifique la densidad correcta del estándar usando un espectrofotómetro . La absorbancia a 625 nm debería ser 0,08 - 0,10 para el estándar 0,5 de Mc Farland.
- (d) Distribuya 4 - 6 ml dentro de tubos similares a los que va a usar para preparar inóculos.
- (e) Mantenga los estándares guardados a temperatura ambiente al abrigo de la luz.
- (f) Agite vigorosamente el estándar antes de su uso para lograr una turbidez homogénea.
- (g) Reemplace o verifique la confiabilidad de los estándares mensualmente.

## 5.0. PROCEDIMIENTO PARA LA REALIZACIÓN DEL TEST DE DIFUSION POR DISCO

### 5.1. Preparación del inóculo

#### 5.1.1. Método de desarrollo previo

<1> Seleccione 4 ó 5 colonias bien aisladas de igual morfología de la placa de cultivo. Prepare una suspensión en 4 ó 5 ml de un caldo apropiado (pej: Tripteina Soja) tocando la parte superior de cada colonia.

<2> Incube a 35 °C hasta que este alcance o exceda la turbidez del estandar (2-6 hs).

<3> Ajuste la turbidez del inóculo con solución salina o caldo hasta el tubo 0,5 de la escala de Mc. Farland, por comparación visual con el estandar. Para ello, mire los tubos contra un fondo blanco con una línea negra como contraste. Esta suspensión contendrá aproximadamente 1 a  $2 \times 10^8$  UFC/ml para *E.coli* ATCC 25922.

### 5.1.2 Método directo de inoculación a partir de colonia aislada

<1> Como un método alternativo al descrito anteriormente el inóculo puede ser realizado en solución salina o caldo a partir de colonias seleccionadas de una placa de cultivo no selectivo de 18 a 24 horas de incubación. Inmediatamente la suspensión debe ser ajustada a la escala 0,5 de Mc Farland según los lineamientos de la sección 5.1.1.

<2> Este método es de elección para microorganismos fastidiosos, ej: *Haemophilus* spp., *Streptococcus* spp. y *Neisseria gonorrhoeae*, (ver sección 6.0.) o para *Staphylococcus* potencialmente meticilino resistentes.

## 5.2. Inoculación de las placas

<1> Dentro de los 15 minutos después de ajustado el inóculo siembre las placas de M. Hinton con un hisopo estéril. Presione el hisopo contra las paredes del tubo a fin de escurrir el exceso de inóculo.

<2> Inocule la superficie seca del M. Hinton por hisopado en tres direcciones para asegurar una completa distribución del inóculo. Las zonas de inhibición serán uniformemente circulares y el desarrollo confluyente o casi confluyente.

<3> Si crecen solo colonias aisladas el antibiograma debe repetirse. Espere de 3 a 5 minutos, pero no más de 15 min. antes de aplicar los discos para que el exceso de humedad superficial sea absorbido.

<4> NOTA: Nunca use cultivos over-night ni otros inóculos no estandarizados para el hisopado de las placas. Evitar extremos en la densidad del inóculo.

## 5.3. Aplicación de los discos de ATB en las placas inoculadas

<a> Colocar los discos sobre la superficie del agar inoculada con pinza estéril aplicando una ligera presión a una distancia no menor a 24 mm desde un centro al otro. Debido a que algunas drogas difunden casi instantáneamente, un disco no debe ser removido una vez que tomó contacto con la superficie del agar. No deben colocarse mas de 12 discos por placa de 150 mm y no mas de 5 discos por placa de 100 mm.

<b> Incubar las placas invertidas a 35 °C dentro de los 15 minutos posteriores a que los discos fueron aplicados. Con excepción de *Haemophilus* spp., *Neisseria gonorrhoeae* y *Streptococcus* spp. (ver sección 6), las placas no deberán ser incubadas en concentración incrementada de CO<sub>2</sub> porque los estándares de interpretación fueron desarrollados usando incubación ambiente y el agregado de CO<sub>2</sub> alteraría significativamente el tamaño de las zonas inhibitorias para algunos agentes antibióticos.

## 5.4. Lectura de las placas e interpretación de resultados

<a> Después de 16 a 18 horas de incubación examine cada placa y mida los diámetros de las zonas de inhibición. Si las placas fueron satisfactoriamente hisopadas y el inóculo fue el correcto, las zonas de inhibición serán uniformemente circulares y habrá desarrollo confluyente. Si el microorganismo estudiado es un *Staphylococcus* spp. o *Enterococcus* spp., incuba 24 horas para vancomicina y oxacilina, pero los otros antimicrobianos pueden leerse entre las 16-18 hs. Use luz transmitida para examinar un ligero crecimiento de cepas meticilino o vancomicina resistentes dentro de las zonas de inhibición. Cualquier desarrollo dentro de la zona de inhibición es indicativo de meticilino o vancomicina resistencia.

<b> El punto final deberá tener en cuenta el área que no muestre desarrollo obvio a ojo desnudo, no incluyendo velo de crecimiento o colonias muy pequeñas que puedan ser detectadas solo con mucha dificultad en el borde de la zona. Colonias mayores creciendo dentro de la zona clara deberán ser subcultivadas, reidentificadas y reensayadas. Algunos *Proteus* spp. podrían presentar “swarming” dentro de las zonas de inhibición con algunos antimicrobianos. En estos casos el el velo del “swarming” debería ser ignorado. En medios suplementados con sangre, se deberá medir la zona de inhibición del crecimiento, no la zona de inhibición de la hemólisis. Cuando se prueban discos de trimetoprima/sulfametoxazol pueden arrastrarse sustancias antagónicas que producen un crecimiento con aspecto de niebla dentro de la zona del halo de inhibición, en estos casos no considerar en la lectura un crecimiento del 20% o menos del desarrollo total.

<c> Los tamaños de las zonas de inhibición serán interpretados con las Tabla 2A, 2B, 2C, 2D, 2E, 2F, 2G, 2H o 2I y los organismos se informarán sensibles, intermedios o resistentes frente al antimicrobiano ensayado.

## 6.0 MICROORGANISMOS FASTIDIOSOS

Los métodos de rutina descriptos anteriormente para los patógenos de crecimiento rápido no son aceptables generalmente para la mayoría de los microorganismos fastidiosos. Cuando se deban probar microorganismos fastidiosos, los métodos deben ser modificados para cada organismo en especial.

La técnica de difusión por discos utilizada para cada microorganismo fastidioso en particular: *H. influenzae*, *N. gonorrhoeae*, *Streptococcus pneumoniae*, y estreptococos B-hemolíticos y del grupo viridans se describirán a continuación y en las Tabla 2E, 2F, 2G y 2H respectivamente. Otras bacterias fastidiosas deberán ensayarse por el método de dilución según el documento M7. Los anaerobios no deberían ensayarse por el método de difusión por disco.

### 6.1. *Haemophilus* spp.

#### 6.1.1. Medio

El medio de elección para la prueba de difusión por discos para *Haemophilus* spp. es el Haemophilus Test Medium (HTM). El HTM contiene los siguientes ingredientes:

- . Mueller - Hinton agar
- . 15 ug/ml  $\beta$ -NAD
- . 15 ug/ml de hematina bovina
- . 5 mg/ml extracto de levadura
- . pH 7,2 - 7,4

Para hacer el HTM, prepare una solución stock fresca de hematina, disolviendo 50 mg en 100 ml de NaOH 0,01 N (0,01 mol /L ) con calor y agitación hasta que el polvo esté totalmente disuelto. Treinta mililitros de la solución stock de hematina son agregados a 1 L de MHA con 5 g de extracto de levadura. Después de autoclavar y enfriar, agregue 3 ml de una solución stock de NAD (50 mg de NAD disueltos en 10 ml de agua destilada, esterilizados por filtración). El agar chocolate no es recomendado para ensayar la sensibilidad de *Haemophilus* spp.

### 6.1.2 Procedimiento

- 1) Realice una suspensión en caldo M. Hinton o solución salina al 0,9 % partir de una placa de agar chocolate incubada durante 20 - 24 horas. Ajuste a una turbidez equivalente al estándar 0,5 Mc Farland ( $1 - 4 \times 10^8$  UFC/ml). Debe tenerse cuidado de no preparar inóculos densos que puedan llevar a resultados falsos resistentes con cefalosporinas, especialmente cuando se trabaja con *H. influenzae* productores de Betalactamasa. Hisope la placa de HTM dentro de los 15 min. de haber ajustado el inóculo.
- 2) El procedimiento a seguir es idéntico al descrito anteriormente para bacterias no fastidiosas (sección 5.2.), con la excepción que no deberán aplicarse más de 9 discos en las placas de 150 mm y no más de 4 discos en las placas de 100 mm.
- 3) Las placas serán incubadas por 16-18 hs. en una atmósfera con 5% CO<sub>2</sub> a 35°C.
- 4) En la lectura se debe considerar la zona de inhibición que no presente desarrollo obvio visible. Un desarrollo débil o pequeñas colonias que podrían aparecer cercanas a la zona mas obvia de inhibición deberán ser ignoradas en la medición.

### 6.1.3. Interpretación

El criterio para la interpretación de la medida de los diámetros de halo están enumerados en la Tabla 2E. Los antibióticos que deben probarse para *Haemophilus* spp están enumerados en la Tabla 1A. No se recomienda la prueba por difusión para *Haemophilus* spp con otros discos que no sean los enumerados en la Tabla 1A .

## 6.2. *Neisseria gonorrhoeae*

### 6.2.1. Medio

El medio recomendado para probar la sensibilidad de *N. gonorrhoeae*, es agar GC autoclavado, con un 1 % de un suplemento de composición definida.  
El agar chocolate enriquecido no es recomendado para determinar la sensibilidad de *N. gonorrhoeae*.

Suplemento para 1 L de agua:

- 1,1 g L cisteína
- 0,03 g guanina HCl
- 3 mg tiamina HCl
- 13 mg PABA
- 0,01 vitamina B 12
- 0,1 g cocarboxilasa
- 0,25 g NAD
- 1,0 g adenina
- 10 g L-glutamina
- 100 g glucosa
- 0,02 g nitrato férrico

**6.2.2. Procedimiento**

- 1) Resuspenda el microorganismo en caldo M. Hinton o sol. salina al 0.9 % a partir de una placa de agar chocolate over night y ajuste a turbidez equivalente al 0,5 Mc Farland. Hisope la placa dentro de los 15 min. de haber ajustado el inóculo.
- 2) El procedimiento a seguir es idéntico al descrito anteriormente para bacterias no fastidiosas (sección 5.2.), con la excepción que no deberán aplicarse más de 9 discos en las placas de 150 mm y no más de 4 discos en las placas de 100 mm cuando se prueben agentes que produzcan grandes zonas de inhibición (p.ej. quinolonas).
- 3) Las placas serán incubadas 20 - 24 horas a 35 °C en atmósfera de CO<sub>2</sub> (5 %).

**6.2.3. Interpretación**

Los antibióticos que deben probarse para *N. gonorrhoeae* están enumerados en la Tabla 1A. No se recomienda la prueba por difusión para *N. gonorrhoeae* con otros discos que no sean los enumerados en la Tabla 1A. La Tabla 2F nos brinda los detalles de criterios de interpretación. Los organismos con diámetros de halo  $\leq 19$  mm con discos de Penicilina de 10 UI generalmente son cepas productoras de  $\beta$ -lactamasa. Sin embargo, para el reconocimiento de esta resistencia plasmídica se prefiere la prueba de betalactamasa. Microorganismos con resistencia plasmídica a la tetraciclina también muestran un diámetro  $\leq 19$  mm (30  $\mu$ g tetraciclina).

Por otra parte existen cepas resistentes a tetraciclina y penicilina por mecanismos cromosómicos que muestran diámetros de inhibición mayores; los cuales pueden ser adecuadamente reconocidas usando los criterios de interpretación indicados en la Tabla 2F.

**6.3. Streptococcus pneumoniae y otros Streptococcus spp.****6.3.1. Medio**

El medio recomendado para *Streptococcus pneumoniae* y otros *Streptococcus* spp. es agar MH suplementado con 5% de sangre desfibrinada de carnero. No son recomendados los medios preparados usando otras bases u otras clases de sangre.

**6.3.2. Procedimiento**

- 1) Resuspenda el microorganismo en caldo MH o sol. salina al 0,9 % a partir de una placa de agar sangre de carnero over night (16-18 hs.) y ajuste a turbidez equivalente al 0,5 de Mc Farland. Hisope la placa dentro de los 15 minutos de haber ajustado el inóculo.
- 2) El procedimiento a seguir es idéntico al descrito anteriormente para bacterias no fastidiosas (sección 5.2.), con la excepción que no deberán aplicarse más de 9 discos en las placas de 150 mm y no más de 4 discos en las placas de 100 mm.
- 3) Las placas serán incubadas a 35 °C en atmósfera con 5 % de CO<sub>2</sub>. por 20 - 24 hs.

**6.3.3. Interpretación**

Los antibióticos sugeridos para *S. pneumoniae* y otros estreptococos están indicados en la Tabla 1A. El criterio para la interpretación de la medida de los diámetros de halo están enumerados en la Tabla 2G y 2H respectivamente.

**NOTA:** Los aislamientos de *S. pneumoniae* con zonas de inhibición para oxacilina  $\geq 20$  mm son considerados sensibles (CIMs  $\leq 0.06$   $\mu$ g) a penicilina. Zonas de inhibición  $\leq 19$  mm pueden obtenerse con cepas resistentes, intermedias y ciertas cepas sensibles a penicilina. Por lo tanto, todos aquellos aislamientos que presenten zonas de inhibición  $\leq 19$  mm con el disco de oxacilina (1  $\mu$ g) se les debería determinar las CIMs a penicilina, meropenem y cefotaxima o ceftriaxona. *S. pneumoniae* no debe informarse como resistente o intermedio a penicilina en base solamente a zonas de inhibición  $\leq 19$  mm con el disco de oxacilina.

No se recomienda usar el disco de OXA (1µg) para determinar la susceptibilidad a penicilina en otros estreptococos distintos a *S.pneumoniae*. El disco de penicilina o ampicilina puede ser usado para predecir la sensibilidad a estreptococos β-hemolíticos, no así para estreptococos del grupo viridans. En aislamientos de *S.viridans* obtenidos de sitios normalmente estériles (p.ej: hueso, LCR, sangre, etc.), debería determinarse la CIM a penicilina. El test de difusión con penicilina (u OXA) no es apropiado para estreptococos del grupo viridans.

## 6.4. Detección de Estafilococos Resistentes

### 6.4.1. Meticilino/Oxacilino Resistencia

Historicamente se ha referido a “metecilino resistencia” como MRSA (para *S. aureus* metecilino resistente) o MRS (para estafilococo metecilino resistente) aún cuando la metecilina no ha sido desde hace tiempo el agente de elección ni para los test de sensibilidad ni para tratamiento. En este documento, usaremos varios términos para referirnos a la resistencia a estos agentes: “MRS”, “metecilino resistencia” u “oxacilino resistencia”. Los problemas asociados con la detección de MRS continúan siendo estudiados por algunos laboratorios. Para el mejor reconocimiento de estas cepas, deberán considerarse los siguientes puntos:

- El disco de oxacilina en la prueba por difusión es más apropiado para detectar resistencia que el disco de metecilina o nafcilina. Por lo tanto se recomienda el uso del disco de oxacilina (1 µg) para la detección de metecilina/oxacilina resistencia.
- El inóculo se debe preparar a partir de una placa de 18 a 24 horas de incubación como se describe en la sección 5.1.2., sin preincubación.
- Los test para detectar MRS deben ser incubados por 24 hs. completas (no 16-18 hs.) a 35 °C .
- Debe inspeccionarse cuidadosamente la zona alrededor del disco de OXA usando luz transmitida para poder así visualizar pequeñas colonias o la presencia de un fino desarrollo dentro de la zona de inhibición.
- La mayoría de los MRS son usualmente resistentes a múltiples antibióticos, incluyendo otros β-lactámicos, aminoglucósidos, macrólidos, clindamicina y tetraciclina. La observación de múltiple resistencia podría ser indicio de metecilino resistencia.
- Si el método de difusión por discos resultara dudoso con un posible *Staphylococcus* spp. metecilino resistente, deberán realizarse pruebas confirmatorias adicionales, tales como el test de screening en agar salado, según el documento M7 NCCLS.
- Los *S. aureus* metecilino resistentes (MRSA) y *S. coagulasa* negativa metecilino resistentes deben informarse como resistentes a todos los cepheems y los otros β-lactámicos, tales como amoxicilina/clavulánico, ampicilina/sulbactam, ticarcilina/clavulánico, piperacilina/tazobactam e imipenem, independientemente de los resultados in-vitro con estos agentes. Esto es debido a que la mayoría de los casos documentados de infecciones por MRSA han respondido pobremente a la terapia con β-lactámicos o porque aún no se han presentado datos clínicos convincentes que documenten la eficacia clínica de estos agentes.

#### 6.4.2. Reducida Sensibilidad a Vancomicina

Ya se han de descrito estafilococos coagulasa negativa con CIMs intermedias y resistentes a vancomicina. El primer *S. aureus* con sensibilidad disminuida a vancomicina (CIM 4 a 8 µg/ml) fue informado en Japón en el año 1997, seguidamente se detectaron cepas con similares características en US y Francia. Se desconoce el exacto mecanismo de resistencia que resulta en estas CIMs elevadas, aunque es probable que involucre alteraciones en la pared celular y en la hiperexpresión de proteínas ligadoras de penicilinas (PBPs). A la fecha, todos estos *S. aureus* parecen haber evolucionado de MRSA. El test de difusión no diferencia cepas con reducida sensibilidad a vancomicina (CIMs 4 - 8 µg/ml) de aquellas cepas sensibles (CIMs 0.5 a 2 µg/ml). Se debe realizar la CIM con el fin de reconocer aquellas cepas con CIM a vancomicina entre 4 y 8 µg/ml. El agar screening con vancomicina descrito para enterococos podría ser usado satisfactoriamente para detectar estos aislamientos, incubando las placas por 24 hs. a 35°C. De cualquier manera, las CIMs deberían ser confirmadas. Es crítico el uso de una cepa sensible a vancomicina, como el *S. aureus* ATCC 29213, como control de calidad a fin de asegurar la especificidad de la prueba. Hasta que no se disponga de datos de prevalencia y significancia clínica de estos aislamientos, los laboratorios deberían examinar en MRSA las CIMs a vancomicina mas cuidadosamente.

#### 6.5. Resistencia en *Enterococcus* spp.

##### 6.5.1. Resistencia a Penicilina / Ampicilina

Los enterococos pueden ser resistentes a penicilina y ampicilina debido a la producción de proteínas ligadoras de penicilina (PBPs) de baja afinidad o a la producción de β-lactamasas. El test de difusión por discos puede detectar adecuadamente aislamientos con PBPs alteradas, pero presenta resultados dudosos con cepas productoras de β-lactamasas estas últimas pueden ser mejor detectadas mediante el uso de Nitrocefín (ver sección 7.0.). Ciertos enterococos penicilino o ampicilino resistentes pueden presentar alto nivel de resistencia (p.ej. CIM a penicilina  $\geq 128$  µg/ml o ampicilina  $\geq 64$  µg/ml). El test de difusión no diferencia aquellos aislamientos con resistencia normal de aquellos con alto nivel. El laboratorio debería determinar la CIM a penicilina o ampicilina para aquellos enterococos aislados de sangre y LCR, dado que *E. faecium* con bajo nivel de resistencia (penicilina  $\leq 64$  µg/ml y ampicilina  $\leq 32$  µg/ml) podrían ser potencialmente sensibles a la sinergia con un aminoglucósido (en el caso de ausencia de alto nivel de resistencia a aminoglucósidos), mientras que cepas con alto nivel de resistencia podrían ser resistentes a tal sinergia.

##### 6.5.2. Resistencia a Vancomicina

Para la detección de enterococos resistentes a vancomicina mediante el método de difusión por discos se requiere que las placas sean incubadas por 24 hs. (en vez de 16 a 18 hs.) , y que las zonas aparentes de inhibición con el disco de vancomicina sean cuidadosamente examinadas con luz transmitida para evidenciar pequeñas colonias o un tenue film de crecimiento dentro de la zona de inhibición. Si un enterococo de una infección severa es categorizado con resistencia intermedia a vancomicina según el método de difusión por discos, este resultado debe verificarse determinando la CIM a vancomicina según el documento M7 NCCLS.

##### 6.5.3. Alto nivel de resistencia a aminoglucósidos

El alto nivel de resistencia a aminoglucósidos en enterococos predice que no se observará sinergia bactericida de penicilina o glicopéptidos con aminoglucósidos. Como screening de este tipo de resistencia pueden usarse discos de alta carga de gentamicina (120 µg) y estreptomycin (300 µg). La ausencia de zonas de inhibición indican resistencia, y diámetros  $\geq 10$  mm son indicativos de ausencia de alto nivel de resistencia. Las cepas que presenten zonas de inhibición entre 7 y 9 mm deben verificarse usando el método de dilución según el documento M7. En la Tabla 3 se muestra como controlar los discos con altas cargas. No es necesario probar otros aminoglucósidos porque sus actividades contra enterococo no son superiores a la gentamicina o la estreptomycin.

**NOTA DE LA EDITORIAL:** En el caso de requerirse el uso de amikacina (ej. infecciones mixtas de enterococos y bacilos gram negativos) se puede predecir su sensibilidad con el disco de kanamicina de alta carga (300 µg), con igual criterio de interpretación que los otros aminoglucósidos.

## 6.6 Detección de β-lactamasas de espectro extendido en bacilos Gram Negativos

Las B-lactamasas de espectro extendido (ESBLs) son enzimas recientemente descritas que provienen de mutaciones en genes que codifican B-lactamasas plasmídicas tales como TEM-1, TEM-2 y SHV-1. Las ESBLs pueden conferir resistencia a cefotaxima, ceftacidima, aztreonam, penicilinas de espectro extendido y β-lactámicos estructuralmente relacionados en aislamientos clínicos de *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *E. coli*, y algunos otros géneros de la flia. Enterobacteriaceae que usualmente son sensibles a B-lactámicos de espectro extendido. Algunas ESBLs confieren resistencia a estos B-lactámicos y pueden ser fácilmente detectadas por el test de difusión con discos (dan resistente o intermedio). Otras, sin embargo, pueden mostrar bajo nivel de resistencia o solo podrían detectarse usando algún B-lactámico en particular. Estos últimos aislamientos podrían no alcanzar el breakpoint de resistencia según NCCLS, a pesar de ser clínicamente resistentes a la terapia B-lactámica. En aislamientos clínicos de *Klebsiella* spp. y *E. coli* con zonas de inhibición disminuidas a cefpodoxima, ceftacidima, aztreonam, cefotaxima, o ceftriaxona podría sospecharse la presencia de ESBLs. A estas cepas se les podría realizar el screening para detectar potenciales ESBL, usando el método descrito en la Tabla 2A. En todas las cepas con ESBLs, los diámetros de las zonas inhibición para una o mas cefalosporinas de espectro extendido o aztreonam deberían aumentar en presencia de ac. Clavulánico (ver ESBL al final de la Tabla 2A). Todas las cepas productoras de ESBL, deberían ser informadas como resistentes a todas las penicilinas, cefalosporinas y aztreonam. Ver Tabla 1 y 2A.

## 7.0. DETERMINACION DE β-LACTAMASAS

### 7.1. Propósito

Una rápida determinación de β-lactamasas brinda información clínica relevante mas tempranamente que el test de difusión por discos con *Haemophilus* spp., *N. gonorrhoeae* y *Moraxella catarrhalis*. Esta prueba es la única confiable para la detección de *Enterococcus* spp. productores de β-lactamasas.

Una determinación positiva de β-lactamasas predice lo siguiente:

- resistencia a penicilina, ampicilina y amoxicilina para *Haemophilus* spp., *N. gonorrhoeae*, *M. catarrhalis*; y
- resistencia a penicilina, acilamino, carboxy y ureidopenicilinas para *Staphylococcus* spp. y *Enterococcus* spp.

Una determinación negativa de β-lactamasa no descarta resistencia debido a otros mecanismos. No corresponde realizar la determinación de β-lactamasas en Enterobacteriaceae, *Pseudomonas* spp. y otros bacilos gram negativos aeróbicos, dado que estos resultados no pueden predecir la susceptibilidad a los diferentes β-lactámicos.

## 7.2. Métodos de detección de $\beta$ -lactamasas

El método de la cefalosporinas cromogénica (Nitrocefín) provee resultados fidedignos con *Haemophilus* spp., *N. gonorrhoeae*, *M. catarrhalis*, *Staphylococcus* spp. y *Enterococcus* spp. .El método acidimétrico provee resultados aceptables con *Haemophilus* spp., *N. gonorrhoeae* y *Staphylococcus* spp. El método iodométrico puede ser usado para *N. gonorrhoeae*. Para *M. catarrhalis* sólo puede usarse nitrocefín. La detección precisa de  $\beta$ -lactamasas en *Staphylococcus* spp. puede requerir la inducción de la enzima y la incubación del test con nitrocefín por arriba de una hora. En estafilococos la detección puede ser fácilmente lograda, realizando la determinación de  $\beta$ -lactamasas con el microorganismo desarrollado en el contorno próximo a la zona de inhibición del disco de OXA. Cada vez que se realice una determinación de  $\beta$ -lactamasas, deberán incluirse controles positivos y negativos.

**NOTA DE LA EDITORIAL: El método iodométrico ha demostrado resultados satisfactorios para la detección de  $\beta$ -lactamasas en *Haemophilus* spp. , *Enterococcus* spp. y *Staphylococcus* spp.**

## 8.0. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS DEL MÉTODO DE DIFUSIÓN POR DISCO

### 8.1. Criterios de interpretación

Las Tablas 2A, 2B, 2C, 2E, 2F, 2G, 2H y 2I indican los criterios de interpretación de los diámetros de las zonas de inhibición que categorizan con precisión el nivel de susceptibilidad de los organismos a varios agentes antimicrobianos. Estas categorías fueron desarrolladas primariamente comparando los diámetros de inhibición con las CIMs de un gran número de aislamientos partir de la distribución poblacional de diámetros y/o CIMs de cepas con conocida sensibilidad y resistencia. En segundo lugar, las CIMs y los diámetros de inhibición correspondiente, fueron analizados en relación con la farmacocinética de la droga en los rangos de dosis normales. En 3er. lugar, el tentativo criterio de interpretación in-vitro ha sido analizado en relación con estudios de eficacia clínica en el tratamiento de patógenos específicos.

### 8.2. Categorías de interpretación

#### 8.2.1. SENSIBLE (S)

Esta categoría implica que una infección dada por la cepa en estudio puede ser tratada apropiadamente con la dosis de antibiótico recomendada para el tipo de infección y la especie infectante, a menos que hubieran contraindicaciones.

Para algunas combinaciones organismo/antibiótico, la ausencia de cepas resistentes excluye la definición de cualquier resultado a otra categoría que no sea “Sensible”. Aquellas cepas que presenten resultados sugestivos de “No sensible” frente a una droga determinada, deberían ser enviadas al laboratorio de referencia para futuros estudios.

#### 8.2.2. INTERMEDIO (I)

Esta categoría incluye cepas que pueden ser inhibidas por concentraciones de antibiótico más elevadas , siempre que las dosis usadas puedan ser aumentadas (pej: Betalactámicos) o que sean concentradas fisiológicamente en el tejido infectado (pej: betalactámicos y quinolonas en orina). También nos indica una "zona buffer" que debería evitar que pequeños factores técnicos difíciles de controlar causen mayores discrepancias de interpretación (drogas afectadas por variaciones en el medio, drogas con limitado margen farmacotóxico, etc.).

#### 8.2.3. RESISTENTE (R)

Las cepas resistentes no son inhibidas por las concentraciones séricas normalmente alcanzadas a dosis habituales y/o caen en el rango donde son comunes mecanismos específicos de resistencia microbiana (por ejemplo Betalactamasas) y la eficacia clínica no ha sido comprobada.

### 8.3. Puntos de cortes equivalentes con la CIM

Los diámetros de los halos de inhibición determinados por el método de difusión correlacionan inversamente con la CIM de las pruebas por dilución, generalmente microdilución en caldo. La correlación entre los puntos de corte de CIM y los diámetros de los halos se determinó basándose en curvas de regresión entre los diámetros de los halos versus la CIM y la distribución poblacional, así como también el análisis farmacocinético y los estudios de eficacia clínica. Son similares a los puntos de corte de CIM definidos en la NCCLS M-7 (métodos para las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos por dilución para las bacterias de crecimiento aeróbico). Sin embargo ocasionalmente pueden existir discrepancias menores dadas por las diferencias técnicas en las metodologías y en las bases de los datos originales.

### 8.4. Comentarios relacionados a la terapia antimicrobiana

Algunos comentarios en las Tablas están relacionados a la terapia antimicrobiana. Estos están señalizados como: **Rx**. Podría ser apropiado incluir algunos de estos comentarios en el informe al paciente. Un ej. podría ser la inclusión de un comentario sobre el aislamiento de enterococos de muestras de sangre: “El tratamiento de endocarditis enterococcicas requiere el uso de terapia combinada con altas dosis de ampicilina o altas dosis de penicilina o vancomicina o teicoplanina mas el agregado de un aminoglucósido como gentamicina o estreptomina para lograr la actividad bactericida”.

## 9.0. CONTROL DE CALIDAD

### 9.1. Propósito

El objetivo de un programa de control de calidad es el monitoreo de:

- la exactitud y precisión del test de susceptibilidad;
- la calidad de los reactivos usados en el test, y
- el desempeño de las personas que llevan a cavo los test y la lectura de los resultados.

### 9.2. Cepas de Referencia para Control de Calidad

Para controlar la precisión y la exactitud del test de difusión, se cuenta con varias cepas control:

- *E. coli* ATCC® 25922
- *P. aeruginosa* ATCC® 27853
- *S. aureus* ATCC® 29223
- *E. faecalis* ATCC® 29212
- *E. coli* ATCC® 35218
- *N. gonorrhoeae* ATCC® 49226 (Agar GC, Tabla 3A)
- *H. influenzae* ATCC® 49247 (HTM, Tabla 3A)
- *H. influenzae* ATCC® 49766 (HTM, Tabla 3A)
- *S. pneumoniae* ATCC® 49619 (MH Sangre de carnero, Tabla 3A)
- *K. pneumoniae* ATCC® 700603

El *E. coli* ATCC® 35218 productor de betalactamasa ha sido designada para el control de calidad de los discos que contengan la combinación "Betalactámico - Inhibidor de betalactamasa", tales como aquellos conteniendo ac. Clavulánico, sulbactam o tazobactam. Si se usa en conjunto con el *E. coli* ATCC® 25922, pueden ser controlados los dos componentes de la combinación en el disco.

Cuando se prueben rutinariamente sulfonamidas, trimetoprima ó trimetoprima/sulfametoxazol, debe controlarse los niveles de timina ó timidina en cada lote nuevo de M. Hinton. Para ello utilice el *E. faecalis* ATCC® 29212 ó 33186. Un medio con alto contenido de inhibidor producirá zonas de inhibición poco definidas, un crecimiento tenue ó se observarán finas colonias dentro del halo de inhibición.

La *K. pneumoniae* ATCC® 700603 se usa como control en la determinación de ESBL (Tabla 2A).

Para controlar los discos de alta carga de aminoglucósidos (GEN 120 µg o STR 300 µg) utilice el *E. faecalis* ATCC® 29212 (Tabla 3).

Si quiere prolongar el tiempo de almacenamiento, puede hacerlo de la siguiente manera: Mantenga los cultivos a -20 °C ó menos (preferentemente a -60 °C o menos o en nitrógeno líquido) en medios apropiados (pej: 10-15 % de glicerol en caldo tripticasa-soja, caldo al 50 % de suero fetal bovino, en sangre de oveja defibrinada ó en leche descremada). Reemplace los cultivos de trabajo por lo menos una vez al mes. Conserve los cultivos de trabajo en agar tripteina soja a 4 - 8 °C y subcultive semanalmente.

### 9.3. Conservación de las cepas de control de calidad

a) Las cepas de control de calidad se deben probar con los procedimientos estándar descriptos en esta norma utilizando los mismos materiales y métodos que se utilizan para las cepas clínicas.

b) Para conservar las cepas por tiempo prolongado es conveniente colocarlas en congeladores a una temperatura  $\leq -20^{\circ}\text{C}$  (preferiblemente a  $-60^{\circ}\text{C}$  o en nitrógeno líquido), utilizando estabilizadores adecuados (por ej.: suero fetal bovino al 50% en caldo, caldo tripticasa soja con 10 a 15% de glicerol, sangre defibrinada de oveja o leche descremada). La liofilización es también un buen método de conservación que no altera la sensibilidad bacteriana a los antibióticos.

c) Las cepas para trabajo diario se deben conservar a 2 y 8°C en estrías de agar tripticasa soja (microorganismos comunes) o de agar chocolate enriquecido (microorganismos nutricionalmente exigentes) y deberán ser repicadas semanalmente. Los cultivos de trabajo se deben reemplazar por lo menos una vez al mes, a partir de la cepa congelada ( $-20^{\circ}\text{C}$ ,  $-60^{\circ}\text{C}$  o nitrógeno líquido), liofilizada o de cultivo comerciales.

d) Antes de ser probadas las cepas se deben subcultivar en un medio sólido con el fin de obtener colonias aisladas. Tanto los aislamientos liofilizados como los congelados se deben repicar dos veces antes de ser usados.

e) Para realizar pruebas de control de calidad, el inóculo bacteriano se debe preparar de acuerdo a las recomendaciones de este manual.

f) Las cepas patrones de control de calidad se pueden utilizar para comprobar la precisión y la exactitud de la prueba de difusión por discos. Si aparecen resultados inexplicables que sugieran un cambio en la sensibilidad de la cepa patrón, se deberá obtener un cultivo fresco a partir de la cepa almacenada.

## 9.4 Límites de control de calidad para la zona de diámetro

Los límites aceptables del test de difusión para una combinación de droga/microorganismo control se presentan en las Tablas 3 y 3A. El comportamiento del sistema de prueba se debe vigilar utilizando esos límites, ensayando cada día que se realice la prueba la cepa control apropiada. Si se documenta un comportamiento satisfactorio (ver Sección 9.5.2.1) se puede pasar al control semanal (ver abajo).

## 9.5. Frecuencia del control de calidad (referirse al apéndice A)

### 9.5.1 Prueba diaria

Cuando el test de difusión se realiza diariamente, para cada combinación antibiótico/organismo, sólo 1 de 20 resultados consecutivos puede estar fuera del rango aceptable (basados en un límite de confianza del 95%, uno de 20 resultados ad random podrían estar fuera de los límites aceptables con la cepa control). Mas de un resultado fuera de lo aceptable en 20 determinaciones consecutivas requiere acciones correctivas (ver Sección 9.6).

### 9.5.2. Prueba semanal

#### 9.5.2.1. Pasaje de la prueba diaria a la prueba semanal (demostración de comportamiento adecuado)

- Pruebe todas las cepas de control de calidad correspondientes diariamente, por el término de 30 días y documente los resultados.
- Para pasar de control diario a semanal, no más de tres de los 30 valores de zonas de diámetro obtenidos diariamente se pueden encontrar fuera de los rangos aceptables para cada combinación droga-microorganismo enumerados en las Tabla 3 y 3A.

#### 9.5.2.2. Implementación del control de calidad semanal

- Se puede pasar al control de calidad semanal sólo cuando se ha documentado un comportamiento satisfactorio de control de calidad diario (ver Sección 9.5.2.1).
- Continuar con el control de calidad una vez por semana y cuando se cambie algún reactivo involucrado en el procedimiento (por ej. nuevo lote de agar, o nuevo lote de discos del mismo o distinto fabricante).
- Si alguno de los controles de calidad semanales está fuera del rango aceptable se requiere una acción correctiva (ver Sección 9.6.)
- Si se adiciona un nuevo agente antimicrobiano, este debe ser probado por 30 días consecutivos y se debe documentar el correcto comportamiento, previamente a que este se pueda controlar semanalmente. Además se requiere la prueba de 30 días consecutivos si se realiza un cambio importante en el método para leer los resultados, como por ejemplo pasar de lectura visual a la utilización de un lector automatizado.

## 9.6. Acciones correctivas

### 9.6.1. Resultados fuera de los rangos aceptables por un error obvio

Si hay una razón obvia para que un resultados se escape de los rangos aceptables como:

- Uso de la cepa control incorrecto,

- Clara contaminación de la cepa o el medio o
- Uso inadvertido de condiciones o temperatura de incubación incorrectas.

Se debe documentar la razón y volver a probar la cepa el mismo día que se detecta el error. Si el resultado de la repetición está dentro de los rangos aceptables, no se requiere ninguna otra acción correctiva.

## **9.6.2. Resultados fuera de los rangos aceptables no causados por un error obvio**

### **9.6.2.1. Acción correctiva inmediata**

Si no hay una razón obvia que justifique el resultado fuera de los rangos aceptables se debe tomar una acción correctiva inmediata.

- Probar la combinación droga/microorganismo involucrada desde el día en que se observa el error y vigilar por el término de 5 días consecutivos. Documentar todos los resultados.
- Si las cinco medidas de diámetro para la combinación droga/microorganismo están dentro de los rangos aceptables definidos en las Tablas 3 y 3A, no se necesita ninguna otra acción correctiva.
- Si algunas de las cinco medidas de diámetro permanecen fuera del rango aceptable, se requiere una acción correctiva adicional (ver Sección 9.6.2.2.)
- Se debe continuar con el control diario hasta que se obtenga una resolución final del problema.

### **9.6.2.2. Acción correctiva adicional**

Cuando la acción correctiva inmediata no resuelve el problema, se deben investigar las siguientes fuentes de error para verificar que:

- las zonas de diámetro fueron medidas y transcriptas correctamente;
- el estándar de turbidez no esté vencido, esté guardado correctamente, cumpla con los requerimientos (ver Sección 4.3.) y que haya sido correctamente homogeneizado antes de su uso;
- todos los materiales utilizados no estuvieran vencidos y que fueron almacenados a la temperatura correcta;
- la estufa de incubación tuviera la temperatura y la atmósfera adecuada;
- estuvieron funcionando correctamente otros equipos utilizados como ejemplo las pipeteadores;
- los discos fueron guardados con disecadores y a la temperatura adecuada;
- las cepas control no han cambiado ni se han contaminado;
- las suspensiones del inóculo se han preparado y ajustado correctamente;
- el inóculo para la prueba fue preparado a partir de una placa incubada el tiempo correcto y en ningún caso por más de 24 hs.

Puede ser necesario obtener una nueva cepa de control de calidad (del congelado o de una fuente confiable) y nuevos lotes de materiales posiblemente de distinto fabricante (incluyendo un nuevo estándar de turbidez). Si el problema parece estar relacionado con un determinado fabricante, éste debe ser contactado. Es útil en algunos casos intercambiar cepas de control de calidad y materiales con otro laboratorio que utilice la misma metodología. Por último, hasta que el problema sea resuelto puede ser necesario utilizar un método alternativo para evaluar la sensibilidad.

Una vez que el problema haya sido corregido, para volver al control de calidad semanal, se debe documentar el comportamiento satisfactorio de las pruebas de control por otros 30 días consecutivos (ver Sección 9.5.2.1.)

### 9.7. Informe de los resultados clínicos cuando se obtienen resultados de control de calidad fuera de los rangos aceptables.

Siempre que se obtenga un resultado fuera de los límites de control o cuando se necesite una acción correctiva, tener en cuenta que el resultado del paciente probablemente este afectado por la fuente de error. Las opciones que se podrían considerar serían: suprimir el resultado del antibiótico, revisar retrospectivamente los resultados obtenidos con los pacientes en forma individual, controlar retrospectivamente los patrones inusuales de sensibilidad; utilizar un método alternativo o recurrir a un laboratorio de referencia hasta que el problema sea resuelto.

## 10. LIMITACIONES DEL METODO DE DIFUSION POR DISCOS

### 10.1. Grupos de microorganismos sobre los que se puede realizar la prueba de difusión

El método de difusión descrito en este documento ha sido estandarizado para patógenos de rápido desarrollo, estos incluyen *Staphylococcus* spp., *Enterococcus* spp., Enterobacteriaceae, *P. aeruginosa*, *Pseudomonas* spp., *Stenotrophomonas maltophilia*, *Acinetobacter* spp. y ha sido modificado para probar algunos microorganismos nutricionalmente exigentes como *Haemophilus* spp. (Tabla 2E) , *N. gonorrhoeae* (Tabla 2F), *Streptococcus* spp. (Tablas 2G y 2H). Para aquellos organismos excluidos de las Tablas 2A a 2I (p.ej. *Campylobacter*, *Corynebacterium* spp., *Bacillus* spp.) aún no se han desarrollado estándares reproducibles para la interpretación de resultados. Estos microorganismos podrían requerir medios o atmósferas de incubación diferentes, o se ha observado marcada diferencia en el grado de crecimiento cepa a cepa. Para estos microorganismos, se recomienda consultar con un especialista en enfermedades infecciosas para determinar la necesidad de realizar la prueba de sensibilidad y la forma de interpretación de los resultados. Los datos publicados en la literatura médica y las actuales recomendaciones consenso para el tratamiento de microorganismos poco frecuentes podría obviar la necesidad de realizar las prueba de sensibilidad. En el caso que sea necesario, el método de dilución usualmente es el método mas apropiado, en ese caso tal vez se requiera enviar el organismo a un centro de referencia.

### 10.2. Resultados erróneos

Se pueden obtener resultados erróneos cuando se realiza pruebas de sensibilidad de algunas drogas y se reportan como sensibles frente a microorganismos específicos. Estas combinaciones incluyen, pero no están limitadas a las siguientes:

- cefalosporinas de 1<sup>era</sup> y 2<sup>da</sup> generación y aminoglucósidos frente a *Salmonella* spp. y *Shigella* spp;
- todos los antibióticos β-lactámicos (excepto oxacilina, meticilina y nafcilina) frente a *Staphylococcus* spp. meticilino resistentes;
- cefalosporinas, aminoglucósidos (salvo para detección de alto nivel de resistencia), clindamicina y trimetoprima/sulfametoxazol frente a enterococos; y
- cefalosporinas frente a *Listeria* spp.

### **10.3. Emergencia de resistencia**

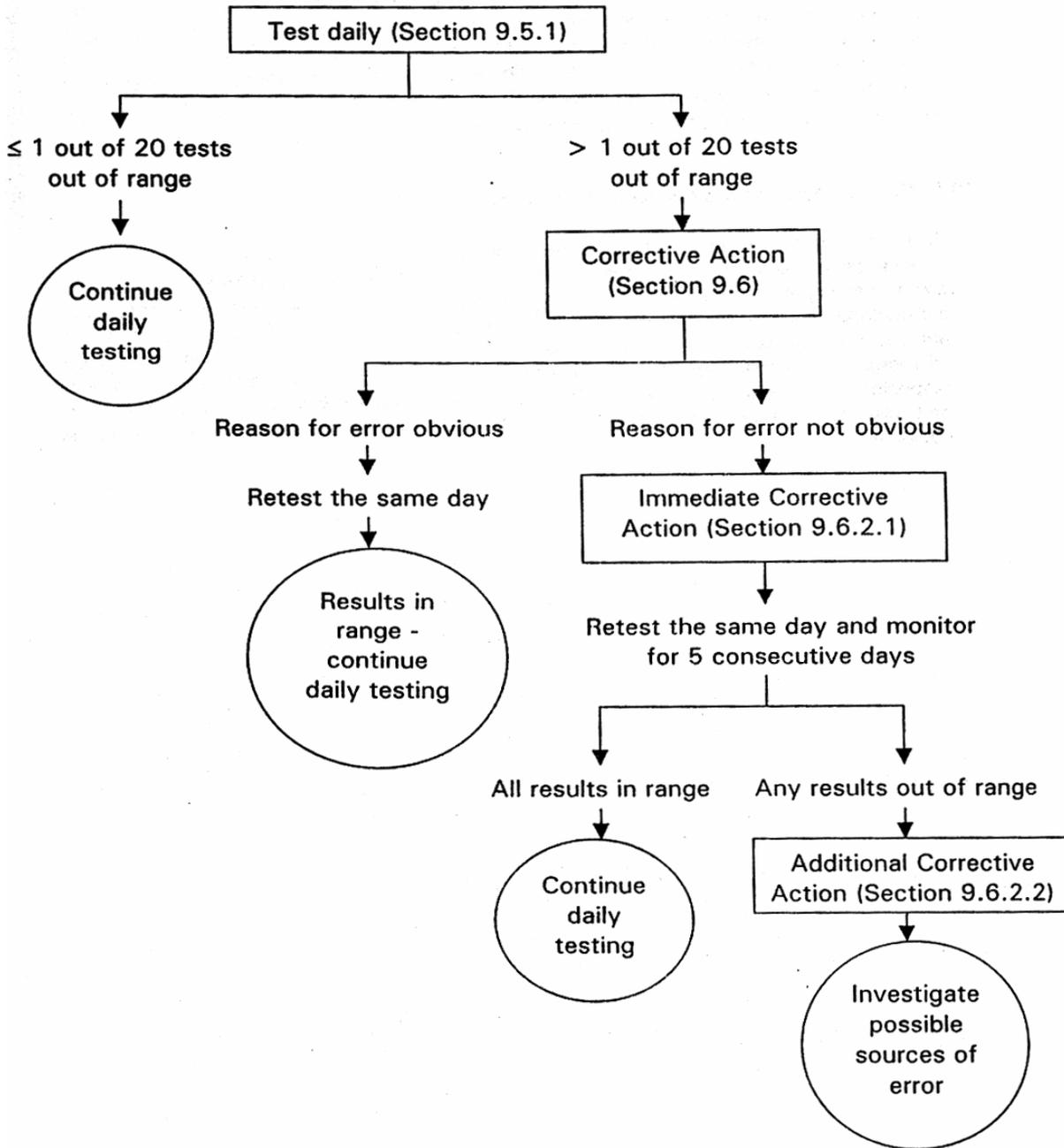
Algunos agentes antimicrobianos se asocian con emergencia de resistencia durante tratamientos prolongados. Es decir que, aislamientos que son inicialmente sensibles podrían transformarse en resistentes dentro de los tres a cuatro días posteriores a la iniciación de la terapia antimicrobiana. Esto ocurre más frecuentemente en *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp. y *Serratia* spp. con cefalosporinas de 3<sup>era</sup> generación; en *P. aeruginosa* con todos los antibióticos; y en *Staphylococcus* spp. con las quinolonas.

### **10.4 Medidas para el aseguramiento de la calidad**

Si se siguen las indicaciones de este estándar, se controlan prácticamente todos los parámetros involucrados en las pruebas de dilución. La obtención de resultados satisfactorios con las cepas patrones de control de calidad no garantiza que se obtendrán también resultados satisfactorios con los aislamientos clínicos. Cuando se obtienen resultados inconsistentes o atípicos con los aislamientos clínicos, las pruebas de sensibilidad y/o la tipificación del microorganismo deben repetirse. Cada laboratorio debería desarrollar sus propias políticas respecto de la verificación de perfiles inusuales de resistencia a los antimicrobianos, particularmente los que tienen muchas probabilidades de tener impacto en el cuidado del paciente.

Appendix A. Quality Control Protocol Flow Charts

Disk Diffusion Daily Quality Control Testing Protocol

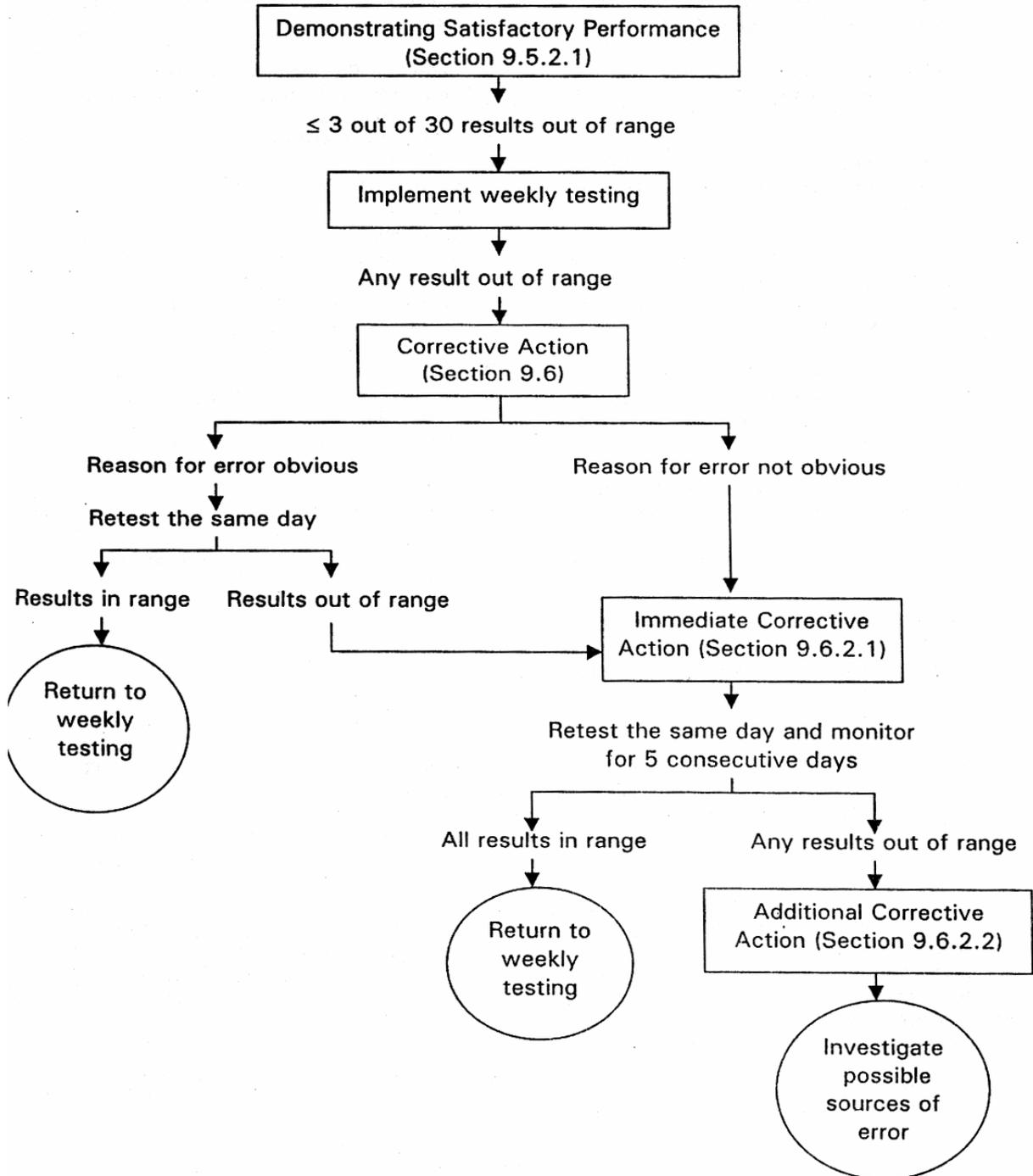


January 2000

NCCLS

Appendix A. (Continued)

Disk Diffusion Weekly Quality Control Testing Protocol



## References

- <sup>1</sup> Ericsson HM, Sherris JC. Antibiotic sensitivity testing. Report of an international collaborative study. *Acta Pathol Microbiol Scand.* 1971;217(suppl B):1-90.
- <sup>2</sup> Rules and Regulations, Antibiotic Susceptibility Discs. *Federal Register.* 1972;37:20525-20529.
- <sup>3</sup> Rules and Regulations, Antibiotic Susceptibility Discs: Correction. *Federal Register.* 1973;38:2756.
- <sup>4</sup> Bauer AW, Kirby WMM, Sherris JC, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol.* 1966;45:493-496.
- <sup>5</sup> NCCLS. *Evaluating Production Lots of Dehydrated Mueller-Hinton Agar; Approved Standard.* NCCLS document M6-A. Wayne, Pennsylvania; 1996.
- <sup>6</sup> NCCLS. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically; Approved Standard—Fifth Edition.* NCCLS document M7-A5. NCCLS: Wayne, Pennsylvania; 2000.
- <sup>7</sup> NCCLS. *Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria; Approved Standard—Fourth Edition.* NCCLS document M11-A4. NCCLS: Wayne, Pennsylvania; 1997.
- <sup>8</sup> Jorgensen JH, Redding JS, Maher LA, Howell AW. Improved medium for antimicrobial susceptibility testing of *Haemophilus influenzae*. *J Clin Microbiol.* 1987;25:2105-2113.
- <sup>9</sup> Jones RN, Gavan TC, Thornsberry C, et al. Standardization of disk diffusion and agar dilution susceptibility tests for *Neisseria gonorrhoeae*: Interpretive criteria and quality control guidelines for ceftriaxone, penicillin, spectinomycin, and tetracycline. *J Clin Microbiol.* 1989;27:2758-2766.
- <sup>10</sup> Jorgensen JH, Swenson JM, Tenover FC, et al. Development of interpretive criteria and quality control limits for broth micro-dilution and disk diffusion antimicrobial susceptibility testing of *Streptococcus pneumoniae*. *J Clin Microbiol.* 1994;32:2448-2459.
- <sup>11</sup> Schwalbe RS, Stapleton JT, Gilligan PH. Emergence of vancomycin resistance in coagulase-negative staphylococci. *N Engl J Med.* 1987;316:927-931.
- <sup>12</sup> Kremery V Jr., Trupl J, Drožna L, Kukuckova E, Oravcova E. Nosocomial bacteremia due to vancomycin-resistant *Staphylococcus epidermidis* in four patients with cancer, neutropenia, and previous treatment with vancomycin. *Eur J Clin Microbiol Inf Dis.* 1996;15:259-261.
- <sup>13</sup> Hiramatsu K, Hanaki H, Ino T, Yabuta, T, Oguri, Tenover FC. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. *J Antimicrob Chemother.* 1997;40:135-136.
- <sup>14</sup> Centers for Disease Control and Prevention. Update: *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin - United States. *Morbidity and Mortality Weekly Rep.* 1997;46:813-815.
- <sup>15</sup> Tenover FC, Lancaster MV, Hill BC, Steward CD, Stocker SA, Hancock GA, O'Hara CM, Clark NC, Hiramatsu K. Characterization of staphylococci with reduced susceptibility to vancomycin and other glycopeptides. *J Clin Microbiol.* 1998;36:1020-1027.
- <sup>16</sup> Murray BE. The life and times of the Enterococcus. *Clin Microbiol Rev.* 1990;3:46-65.
- <sup>17</sup> Torres C, Tenario C, Lantero M, Gastañares, Baquerò F. High-level penicillin resistance and penicillin-gentamicin synergy in *Enterococcus faecium*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 1993;37:2427-2431.
- <sup>18</sup> Murray BE. Vancomycin-resistant enterococci. *American Journal of Medicine.* 1997;102:284-293.

January 2000

NCCLS

**References (Continued)**

- <sup>19</sup> Jacoby GA, Medeiros AA. More extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 1991;35:1697-1704.
- <sup>20</sup> Swenson JM, Hindler JA, Peterson LR. Special tests for detecting antibacterial resistance. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, et al, eds. *Manual of Clinical Microbiology.* 6th ed. Washington DC: American Society for Microbiology; 1995:1356-1367.
- <sup>21</sup> Doern GV, Tubert TA. Detection of  $\beta$ -lactamase activity among clinical isolates of *Branhamella catarrhalis* with six different  $\beta$ -lactamase assays. *J Clin Microbiol.* 1987; 25:1380-1383
- <sup>22</sup> NCCLS. *Development of In Vitro Testing Criteria and Quality Control Parameters—Third Edition; Approved Guideline.* NCCLS document M23-A. Wayne, Pennsylvania; 1995.

## DETERMINACION DE LA SENSIBILIDAD A LOS ANTIMICROBIANOS POR EL METODO DE DILUCION

### 1.0 INTRODUCCION

Las técnicas de dilución en caldo o agar, se pueden utilizar para medir cuantitativamente la actividad "in vitro" de un antimicrobiano frente a un cultivo bacteriano. Estos métodos se basan en la preparación de una serie de tubos o placas con caldo o agar, respectivamente, a los cuales se les agrega el antibiótico (ATB) en distintas concentraciones. Luego se inoculan cada uno de los tubos o las placas con una suspensión estandarizada del microorganismo en estudio. Las pruebas se examinan después de incubar 18 a 24 hs. a 35°C y se determina la concentración inhibitoria mínima (CIM) del antimicrobiano frente al microorganismo ensayado. El resultado final depende significativamente de la metodología empleada. Por ello, para obtener valores reproducibles intra e interlaboratorios, cada detalle técnico debe ser cuidadosamente controlado.

En este documento se describen las técnicas estandarizadas de dilución en caldo (Macro-Microdilución) y el método de dilución en agar. Las bases para la realización de estas metodologías derivan, en gran parte, de la información generada por un estudio colaborativo internacional (1). Aunque estos métodos son referenciales, algunos son lo suficientemente prácticos para ser desarrollados tanto en los laboratorios clínicos como en los de investigación. Existen también sistemas comerciales que se basan, al menos en parte, en los mismos conceptos y dan resultados equivalentes a los obtenidos con las técnicas descriptas en este documento. La aprobación de estos sistemas comerciales, en los EEUU, es responsabilidad de la United States Food and Drug Administration (U.S. FDA). El NCCLS no aprueba productos ni dispositivos comerciales.

Las técnicas que se describen en este documento fueron diseñadas para ensayar bacterias de fácil desarrollo después de 18 - 24 hs. de incubación en medio M. Hinton sin suplementos. Para algunos microorganismos fastidiosos se describen métodos y medios alternativos en la sección 8 y en las Tablas 2E-2J y Tabla 7 de este documento. La metodología para evaluar la sensibilidad de bacterias anaeróbicas se encuentra en el documento M11, "Métodos para evaluar la sensibilidad a los antimicrobianos de bacterias anaerobias" del NCCLS (2).

### 2.0 INDICACIONES PARA REALIZAR PRUEBAS DE SENSIBILIDAD

Las pruebas de sensibilidad deben realizarse sólo sobre microorganismos asociados a infecciones cuando su sensibilidad no se pueda predecir a partir de su identificación. La determinación de la sensibilidad está indicada en los casos en que el microorganismo causal de la infección pertenezca a una especie capaz de exhibir resistencia a los antibióticos de uso clínico. Los mecanismos de resistencia a los agentes antimicrobianos incluyen: producción de enzimas inactivantes, alteraciones en el sitio de acción y modificaciones en el ingreso o el eflujo de las drogas. Para los microorganismos que posean sensibilidad antibiótica predecible se recomienda la aplicación de la terapia empírica adecuada. Rara vez se realizan pruebas de sensibilidad para microorganismos sensibles a una droga altamente eficaz, (por ej. *Streptococcus pyogenes* que ha mantenido invariable su sensibilidad a penicilina). En caso de infecciones causadas por *S. pyogenes* en pacientes alérgicos a la penicilina, para terapia alternativa, se puede ensayar la sensibilidad a la eritromicina u otros macrólidos, debido a que pueden existir cepas resistentes a estas drogas. Las pruebas de sensibilidad también son importantes en estudios de epidemiología de la resistencia y de nuevos agentes antimicrobianos.

Para realizar pruebas de sensibilidad e identificación se debe partir de un cultivo primario en medio sólido y se debe procesar una colonia aisladas de cada tipo de microorganismo que pueda tener rol patógeno. No se deben realizar pruebas de sensibilidad sobre mezclas de diferentes tipos de microorganismos, ni sobre el material clínico sin procesar, excepto para emergencias clínicas donde la coloración de Gram sugiera la presencia de un sólo patógeno. Cuando la prueba de sensibilidad haya sido realizada a partir del material clínico, se debe informar como resultado preliminar y se debe repetir utilizando la metodología estandarizada. No es aconsejable la realización de pruebas de sensibilidad, cuando no es clara la naturaleza de la infección y la

muestra contiene flora normal o polimicrobiana, en la cual el o los microorganismos aislados probablemente tengan poca relación con el proceso infeccioso. En estos casos los resultados obtenidos pueden conducir a errores en el tratamiento.

El valor de CIM obtenido por el método de dilución, orienta al clínico sobre que concentración de antibiótico necesita alcanzar en el sitio de infección para inhibir el microorganismo infectante. La CIM, sin embargo, no representa un valor absoluto. La CIM real puede estar entre la menor concentración de antibiótico que inhibe al microorganismo y la siguiente donde se observa desarrollo del mismo. Si por ejemplo, fueran probadas diluciones al medio y se determina una CIM de 16 µg/ml, el verdadero valor podría estar entre 16 y 8 µg/ml. Debe tenerse en cuenta que a pesar de realizar las pruebas de dilución bajo condiciones cuidadosamente controladas, no siempre se obtienen los mismos resultados. Generalmente, la reproducibilidad de esta prueba es de +/- 1 dilución.

La metodología más común para la determinación de La CIM es la que utiliza diluciones seriadas al medio (por ej. 1,2,4,8,16 µg/ml, etc.). También existen otros esquemas de dilución, que utilizan unas pocas concentraciones (hasta dos), concentraciones "Breakpoint" o que agregan concentraciones entre las que se ensayan normalmente (por ej. 4, 6, 8, 12, 16 µg/ml) . Los resultados de estos métodos alternativos pueden ser igualmente útiles en la clínica; sin embargo, a veces son más difíciles de controlar (ver sección 12.3). Cuando se produce inhibición del crecimiento con la menor concentración utilizada, el verdadero valor de la CIM no se puede determinar exactamente y debe informarse como igual o menor que dicha concentración. Cuando se ensayan concentraciones adicionales entre las usuales y la CIM es una de esas concentraciones intermedias, la interpretación de la prueba se debe hacer después de redondear el valor a la próxima superior dilución al medio del esquema normal (por ej. Una CIM de 6 µg/ml se debe redondear a 8 µg/ml y luego interpretar).

Cuando se informa al clínico el resultado de la CIM, el valor debe ser acompañado por su correspondiente interpretación (por ej. SENSIBLE, INTERMEDIO o RESISTENTE ) que se obtiene aplicando los criterios enumerados en las Tablas 2A – 2J y Tabla 7. Cuando las CIMs se realizan con 4 o menos concentraciones consecutivas, o con concentraciones no consecutivas, se debe informar la correspondiente interpretación. Si se desea se puede informar además el rango de CIM.

### **3.0. AGENTES ANTIMICROBIANOS**

#### **3.1. Fuentes**

Los antibióticos estándar o de referencia se pueden obtener directamente del laboratorio productor o de otras fuentes comerciales. No se recomienda la utilización de las preparaciones para aplicación parenteral. Para las pruebas de sensibilidad se debe conocer el lote, la potencia (generalmente expresada en µg ó UI/mg de polvo) y la fecha de vencimiento de los antimicrobianos de referencia. El almacenamiento de la droga debe hacerse según las recomendaciones del laboratorio productor, o a una temperatura igual o menor a -20°C en un desecador (preferiblemente con vacío) provisto de algún material desecante como gel de sílice o cloruro de calcio. Cuando se saca el desecador del freezer se debe esperar que tome temperatura ambiente antes de abrirlo para evitar que el agua de condensación humedezca las drogas.

#### **3.2 Pesada de los antibióticos**

A todos los agentes antimicrobianos se les realiza el ensayo de actividad. La actividad de una determinada droga puede variar entre los distintos productores y entre los distintos lotes del mismo productor. Por esto es muy importante conocer el dato de potencia de cada frasco de antimicrobiano que va a ser utilizado para realizar pruebas de sensibilidad por dilución y en base a dicho dato, hacer los cálculos para la preparación de las soluciones a utilizar. Para determinar la cantidad de polvo antimicrobiano (ATB) o solvente necesarios para preparar una solución estándar (SE) se puede utilizar alguna de las siguientes fórmulas:

## Fórmula 1

$$\text{Pesada de ATB (mg)} = \frac{\text{Volumen de SE (ml)} \times \text{Concentración de SE (\mu\text{g/ml})}}{\text{Potencia de ATB (\mu\text{g/mg})}}$$

## Fórmula 2

$$\text{Volumen de SE (ml)} = \frac{\text{Pesada de ATB (mg)} \times \text{Potencia de ATB (\mu\text{g/mg})}}{\text{Concentración de SE (\mu\text{g/ml})}}$$

La pesada del antibiótico a ensayar se debe hacer en balanza analítica bien calibrada, con una precisión igual o superior al décimo de miligramo, y se debe evitar pesar cantidades muy pequeñas de droga ya que estas acarrearán alto error (si es posible se recomienda pesadas superiores a los 100 mg). Es posible que al realizar la pesada se obtenga un exceso de la droga, en tal caso se debe aplicar la fórmula 2 para conocer el exacto volumen de solvente a agregar para obtener la concentración deseada.

Ej.: Para preparar aproximadamente 100 ml de una solución madre de 1280  $\mu\text{g/ml}$  de agente antimicrobiano con una potencia de 750  $\mu\text{g/mg}$  deben pesarse entre 170 y 200 mg de droga. Si el peso final del antibiótico fue 182,6 mg, el volumen de solvente necesario para diluir el mismo se calcula de la siguiente manera:

$$\text{Volumen (ml)} = \frac{182,6 \text{ mg} \times 750 \mu\text{g/mg}}{1280 \mu\text{g/ml}} = 107 \text{ ml}$$

En este caso los 182,6 mg de droga pesada se deben disolver en 107 ml de diluyente.

### 3.3. Preparación de las soluciones

Se deben preparar soluciones madres de por lo menos 1000  $\mu\text{g/ml}$  (por ej.: 1280  $\mu\text{g/ml}$ ) ó de una concentración 10 veces mayor que la más alta del rango establecido (por ej.: para un rango establecido de 2 a 512  $\mu\text{g/ml}$  se podría preparar una solución madre de 5120  $\mu\text{g/ml}$ ), y conservarse en alícuotas a  $-60^{\circ}\text{C}$  por 6 meses ó más, salvo indicación expresa de la bibliografía. En algunos casos el límite de solubilidad del antimicrobiano sólo permite preparar soluciones de concentraciones bajas.

Para las drogas que no son solubles en agua, se debe proceder de la siguiente manera:

- 1) Use solamente la cantidad mínima del solvente (metanol, acetona, cloroformo, etc) necesaria para solubilizar la droga.
- 2) Diluya hasta alcanzar el volumen final calculado, con agua estéril o con el buffer estéril adecuado como se indica en la Tabla 4.
- 3) Si se van a utilizar solventes potencialmente tóxicos, asegúrese de tomar todos los recaudos necesarios para el manejo que indica el fabricante (ver Tabla 4)

La contaminación de las soluciones es extremadamente rara, por lo tanto pueden utilizarse soluciones no esterilizadas. Si se desea, sin embargo, las soluciones pueden ser esterilizadas por filtración a través de membranas; se debe tener la precaución de no utilizar materiales que adsorban ATB. (Como por ejemplo: papel, asbestos o filtros de vidrio sinterizado).

Se pueden distribuir pequeños volúmenes de las soluciones madres estériles, en viales de vidrio, polipropileno, poliestireno o polietileno, y conservar a una temperatura de  $-60^{\circ}\text{C}$  o menor. De esta manera las soluciones se mantienen por 6 meses o más, sin que se observen pérdidas importantes de actividad (nunca se deben conservar soluciones de antimicrobianos a una temperatura superior a  $-20^{\circ}\text{C}$ ). Cada vez que se descongela un vial, se debe utilizar en el día y el sobrante del mismo debe descartarse, nunca se debe volver a congelar una solución de antibiótico. Si existe deterioro de la actividad en las soluciones almacenadas, se verá reflejado

en los resultados de las cepas de control de calidad que deben acompañan a cada determinación.

### **3.4. Número de concentraciones probadas**

Las concentraciones a ensayar para un determinado antibiótico, en general, deberían determinarse de acuerdo a los puntos de corte que se enumeran en las Tablas 2A – 2J, pero el número de concentraciones deberá ser elegido por quien realiza la prueba. Sin embargo, se recomienda elegir el rango de concentraciones de manera tal que incluya el rango de CIM de al menos una cepa patrón de control de calidad. En algunos casos especiales puede ser necesario ensayar concentraciones inusuales (por ej. para evaluar el efecto sinérgico entre aminoglucósidos y penicilinas o glicopéptidos frente a enterococos puede ser necesario ensayar altas concentraciones de gentamicina y estreptomina).

## **4.0. SELECCION DE LOS AGENTES ANTIMICROBIANOS PARA LAS PRUEBAS DE RUTINA E INFORME DE LOS RESULTADOS**

Ver M2 – A6, 3.0 (Prueba de difusión por discos).

### **4.1. Informes de rutina**

Ver M2 – A6, 3.1 (Prueba de difusión por discos).

### **4.2. Nombre genérico**

Ver M2 – A6, 3.2 (Prueba de difusión por discos).

#### **4.2.1. $\beta$ -lactámicos**

Ver M2 – A6, 3.2.1. (Prueba de difusión por discos).

#### **4.2.2. Glicopéptidos**

Ver M2 – A6, 3.2.2. (Prueba de difusión por discos).

#### **4.2.3. Aminoglucósidos**

Ver M2 – A6, 3.2.3. (Prueba de difusión por discos).

#### **4.2.4. Macrólidos**

Ver M2 – A6, 3.2.4. (Prueba de difusión por discos).

#### **4.2.5. Tetraciclinas**

Ver M2 – A6, 3.2.5. (Prueba de difusión por discos).

#### **4.2.6. Quinolonas**

Ver M2 – A6, 3.2.6. (Prueba de difusión por discos).

#### **4.2.7. Sulfonamidas y trimetoprima**

Ver M2 – A6, 3.2.7. (Prueba de difusión por discos).

#### **4.2.8. Clases de antibióticos con una sola droga**

Ver M2 – A6, 3.2.8. (Prueba de difusión por discos).

### **4.3. Guía para la selección de antimicrobianos**

Ver M2 – A6, 3.3. (Prueba de difusión por discos).

## 5.0 PREPARACION DEL INOCULO PARA LAS PRUEBAS DE DILUCION

### 5.1. Turbidez del estándar para la preparación del inóculo

Ver M2 – A6, 4.3. (Prueba de difusión por discos).

### 5.2. Método de desarrollo previo

Ver M2 – A6, 5.1.1. (Prueba de difusión por discos).

### 5.3. Método directo de inoculación a partir de colonia aislada

Ver M2 – A6, 5.1.2. (Prueba de difusión por discos).

## 6.0 PROCEDIMIENTO PARA LA DILUCION EN AGAR

La dilución en agar es un método bien establecido para la determinación de la sensibilidad a los antimicrobianos (1,3). El agente antimicrobiano se incorpora dentro del medio con agar, de manera tal que cada placa contenga una concentración de antibiótico diferente. Los inóculos de los distintos microorganismos se puede aplicar rápida y simultáneamente sobre la superficie del agar utilizando un replicador de Stern (4). La mayoría de los replicadores existentes transfieren de 32 a 36 inóculos a la vez por cada placa.

### 6.1. Materiales y reactivos

#### 6.1.1. Agar Mueller Hinton

El agar M. Hinton demostró ser, de todos los medios disponibles, el mejor para las pruebas de sensibilidad de rutina de bacterias no fastidiosas, por las siguientes razones:

- Muestra buena reproducibilidad de los resultados de sensibilidad entre distintos lotes.
- Tiene baja cantidad de inhibidores para sulfonamidas, trimetoprima y tetraciclinas.
- Permite buen crecimiento de la mayoría de los patógenos.
- Se tiene gran cantidad de datos y experiencia sobre pruebas de sensibilidad realizadas con este medio.

Aunque el agar M. Hinton es un medio confiable para realizar las pruebas de sensibilidad, los resultados obtenidos con algunos lotes, en ocasiones, pueden variar significativamente. Sólo se deben utilizar lotes de agar M. Hinton evaluados de acuerdo al documento M6, “Protocolos para la evaluación del agar Mueller Hinton deshidratado” (5), del NCCLS, cuyos resultados estén dentro de los límites que se describen en dicho documento.

- Los lotes nuevos de medio deben ser controlados antes de ser usados en clínica (ver sección 12.5).
- El agar M. Hinton se debe preparar a partir del polvo deshidratado según las recomendaciones del fabricante. Después de autoclavar, el agar se debe enfriar en baño de agua a 48-50°C antes de agregarle, en forma estéril, las soluciones de antimicrobianos y/o suplementos sensibles al calor, y finalmente colocarlo en las placas correspondientes (Ver 6.2)
- El pH del agar M. Hinton (MH) se debe controlar cada vez que se prepara un nuevo lote. La metodología a emplear dependerá del tipo de equipamiento disponible en cada laboratorio. El pH del agar MH debe estar entre 7,2 y 7,4 a temperatura ambiente, por lo tanto se debe probar después de solidificado. La determinación del pH es muy importante porque a valores bajos algunas drogas pierden actividad (por ej.: aminoglucósidos y macrólidos), y otras la incrementan (por ej.: penicilinas). Si el pH es demasiado alto se observa el efecto opuesto. El pH se puede determinar de alguna de las siguientes maneras:

- Macerando la cantidad suficiente de agar para que el bulbo del electrodo del pHmetro quede totalmente sumergido.
- Permitiendo que una pequeña cantidad de agar solidifique alrededor del bulbo del electrodo del pHmetro.
- Mediante el uso de un electrodo de superficie bien calibrado.
- No es necesario adicionar cationes al agar M. Hinton. Para detectar metilino resistencia en estafilococos debe agregarse, al agar, NaCl 2 % p/v.
- El agregado de suplementos se realiza sólo cuando es necesario, para probar los microorganismos que no crecen sin ellos. Los suplementos utilizados son sangre defibrinada de oveja ó caballo al 5% (v/v) como se muestra en las tablas 2H, 3A y 7. El pH debe ser determinado después de agregar el suplemento al medio esterilizado.
- El medio apropiado para realizar las pruebas de dilución en agar de *Neisseria gonorrhoeae* es el agar base GC con suplementos (6).
- Información adicional sobre el método de dilución y pruebas de “screening” para algunos microorganismos con requerimientos nutricionales especiales se presentan en las secciones 8 y 9 así como también en la Tabla 7.

## 6.2. Preparación de las placas de agar

### 6.2.1. Procedimiento

<1> Agregue la solución de antibiótico apropiada para cada dilución, en el agar fundido y enfriado a 48 - 50°C en baño de agua.

<2> Agite la mezcla agar-antibiótico y colóquela en la placa de petri hasta alcanzar una profundidad de 3-4 mm.

<3> La mezcla agar-antibiótico debe ser colocada rápidamente en las placas para evitar la solidificación total o parcial de la misma dentro del recipiente de mezclado.

<4> Si las placas no se usan de inmediato se pueden guardar a 4 - 8°C por 5 días para ensayos de referencia o por mayor tiempo para uso de rutina. El almacenamiento de las placas se debe hacer en bolsas de plástico para evitar su desecación. En un estudio se comprobó que las placas conteniendo cefaclor se deben preparar 48 hs. Antes de su utilización debido a la rápida degradación de la droga; en cambio las placas conteniendo cefamandol permanecen estables por un tiempo superior al recomendado de 5 días (7). Otros antimicrobianos particularmente lábiles como el cefaclor son: ampicilina, metilina, imipenem y ácido clavulánico.

**NOTA:** No se puede asegurar que todos los antibióticos mantengan su actividad en estas condiciones, por lo tanto siempre es necesario evaluar el estado de los antibióticos mediante la prueba de cepas patrones de control de calidad.

<5> Antes de ser utilizadas, las placas deben ser equilibradas a temperatura ambiente y no deben tener gotas de agua sobre la superficie. Si las placas estuvieran mojadas se deben colocar abiertas, por aproximadamente 30 minutos, en una incubadora o en un gabinete de flujo laminar para eliminar el exceso de agua.

### 6.2.2. Esquema para la preparación de las diluciones

En general se utiliza el esquema de la Tabla 5 que recomienda la dilución de una parte de la solución de antimicrobiano en 9 partes del agar fundido.

### 6.2.3. Frecuencia de los controles

Aunque en estas normas se recomienda el control de calidad semanal de las placas con antibiótico; algunas drogas necesitan controlarse con mayor frecuencia debido a que se degradan rápidamente. Se presentan ejemplos de este tipo de drogas en la sección 6.2.1. Para más detalles ver sección 12.

### 6.2.4. Placas de control de crecimiento

El control de viabilidad de los microorganismos a los cuales se le evaluará la sensibilidad, se realiza inoculándolos sobre placas sin antibiótico. El agregado o no de suplementos dependerá de las necesidades nutricionales de la bacteria en estudio (ver sección 6.1.1).

## 6.3. Inóculo

### 6.3.1. Preparación del inóculo

El inóculo estandarizado para el método de dilución en agar, se puede preparar permitiendo el crecimiento del microorganismo hasta la turbidez 0,5 de la escala de McFarland o bien resuspendiendo colonias directamente hasta alcanzar dicha turbidez (Ver sección 5). La preparación del inóculo inicial y la dilución final del mismo, puede variar para algunos microorganismos como *Helicobacter pylori* (ver Tabla 2J).

### 6.3.2. Dilución de la suspensión bacteriana

El cultivo ajustado a la turbidez equivalente al patrón 0,5 de McFarland contiene, para la mayoría de las especies, aproximadamente  $1-2 \times 10^8$  UFC/ml. El inóculo final requerido para la prueba de dilución en agar es de  $10^4$  unidades formadoras de colonias (UFC) por “spot” de 5 – 8 mm de diámetro. Por lo tanto se debe diluir la suspensión bacteriana, ajustada al 0,5 de McFarland, 1/10 en caldo estéril o solución fisiológica obteniéndose de esta manera una concentración de  $10^7$  UFC/ml. La mayoría de los aplicadores depositan sobre la superficie del agar, aproximadamente 1 - 2  $\mu$ l. Entonces el inóculo final absoluto sobre el agar es de alrededor de  $10^4$  UFC por “spot”. Una vez ajustado, el inóculo debe utilizarse dentro de los 15 min.

## 6.4. Inoculación de las placas de agar

1) Los tubos que contienen la suspensión bacteriana ajustada y diluida ( $10^7$  UFC/ml) se deben colocar en orden en una gradilla. Luego se debe distribuir una alícuota de cada tubo, bien homogeneizado, en el correspondiente pocillo de la policubeta del replicador.

2) Se debe marcar cada placa de agar para conocer la ubicación de los inóculos en la misma.

3) Aplicar una alícuota de 1 a 2  $\mu$ l de cada inóculo sobre la superficie del agar, por medio del replicador, ansa calibrada o pipeta. La mayoría de los replicadores usan pernos de metal (generalmente de 3 mm de diámetro) para transferir 1 o 2  $\mu$ l del inóculo de cada pocillo de la policubeta a la placa de agar.

4) Para comenzar se debe inocular una placa control de agar sin antibiótico (control de viabilidad) y luego se inoculan las que contienen las distintas concentraciones del antibiótico comenzando por la de menor concentración. Se debe inocular una segunda placa control de viabilidad al finalizar la serie, para confirmar que no hubo contaminación ó un significativo efecto "carry over" de antibiótico durante el procedimiento.

5) Se debe reaislar una muestra de cada inóculo sobre una placa de medio de cultivo sólido, e incubar "over night" para detectar mezcla de cultivos y para contar, al día siguiente, con un cultivo fresco en caso que la prueba se deba repetir.

## 6.5. Incubación de las placas

1) Las placas inoculadas se deben mantener a temperatura ambiente hasta que el agar absorba el líquido que acompaña al inóculo pero no más de 30 minutos. Luego se deben incubar invertidas a 35°C por el término 16 - 20 hs. (ver Sección 9 para *Staphylococcus aureus* meticilino resistentes y enterococos vancomicina resistentes. Ver otras excepciones en Tabla 7).

2) Cuando se prueban microorganismos sin exigencias nutricionales se deben incubar las placas sin atmósfera de CO<sub>2</sub>, ya que este procedimiento puede alterar el pH de la superficie del agar. A pesar de esto *N. gonorrhoeae* y *Streptococcus* spp. se deben incubar en una atmósfera que contenga 5 - 7 % de CO<sub>2</sub> (ver Sección 8, Tablas 2F-2H y Tabla 7). *Helicobacter pylori* debe ser incubado en atmósfera de microaerofilia (ver Tabla 2J)

## 6.6. Determinación del punto final

1) Para determinar el punto final, las placas se deben colocar sobre una superficie oscura y opaca. La CIM se registrará como el valor de la menor dilución que inhibe completamente el desarrollo bacteriano, no se debe considerar el desarrollo de una simple colonia o una tenue película causada por el depósito del inóculo. Algunos antagonistas del medio de cultivo pueden permitir un leve desarrollo bacteriano cuando se ensaya trimetoprima o sulfonamidas. El punto final en estos casos corresponderá a la concentración en la que haya más del 80 % de reducción del crecimiento comparando con el control.

2) Si persisten 2 o más colonias en concentraciones superiores al aparente punto final, o si se encuentra desarrollo a altas concentraciones y no a bajas, se debe controlar la pureza del cultivo y probablemente deba repetirse la prueba.

## 7.0 METODO DE DILUCION EN CALDO (MACRO Y MICRODILUCION)

### 7.1. Caldo Mueller Hinton

1) El caldo M. Hinton es el medio recomendado para las pruebas de sensibilidad de patógenos aeróbicos o facultativos de crecimiento rápido (1). La reproducibilidad de los resultados de las pruebas de sensibilidad utilizando diferentes lotes de este medio es buena; tiene bajo contenido de inhibidores de sulfonamidas, trimetoprima y tetraciclina y permite el crecimiento de la mayoría de los gérmenes patógenos. Además se han acumulado un gran número de resultados y experiencias utilizando este medio para las pruebas de sensibilidad. El caldo MH se puede suplementar para permitir el crecimiento de bacterias nutricionalmente exigentes, por ejemplo: (HTM) Medio para prueba de *Haemophilus* spp. (8). Para determinar la sensibilidad de los estreptococos se debe agregar sangre. Las recomendaciones específicas para suplementar este medio se encuentran en las secciones 8 y 9 y en las Tablas 2E-2H y 7.

2) Las características químicas y el comportamiento en las pruebas de sensibilidad del caldo Mueller Hinton se deben controlar de rutina. El pH de este medio se debe determinar después de preparado. La determinación se debe hacer con pHmetro a temperatura ambiente (25 °C) y debe estar entre 7,2 y 7,4.

3) Si el caldo MH no tiene las cantidades correctas de cationes divalentes Ca<sup>++</sup> y Mg<sup>++</sup> (Ca<sup>++</sup> :20 - 25 mg/l y Mg<sup>++</sup> :10 - 12,5 mg/l), las CIM de aminoglucósidos frente a *P. aeruginosa* y la CIM de tetraciclina frente todas las bacterias, podrían ser diferentes de los resultados obtenidos por el método de dilución en agar. Algunos fabricantes proveen el caldo Mueller Hinton con la concentración de cationes adecuada. Por lo tanto sólo se debe ajustar el contenido de cationes de los medios que no tengan la certificación del fabricante en cuanto a la concentración de calcio y magnesio o cuando la determinación de estos cationes por espectrofotometría de absorción atómica indique que están en defecto. Por otra parte el agregado de cationes en exceso puede conducir también a resultados erróneos.

#### Ajuste de la concentración de cationes

a) La solución madre de  $MgCl_2$  para realizar el ajuste debe contener 10 mg/ml de  $Mg^{++}$ . (Disuelva 8,36 g de  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$  en 100 ml de agua desionizada).

b) La solución madre de  $CaCl_2$  para realizar el ajuste debe contener 10 mg/ml de  $Ca^{++}$  (Disuelva 3,68 g de  $CaCl_2 \cdot 2 H_2O$  en 100 ml de agua desionizada).

Las soluciones madres deben ser esterilizadas por filtración a través de membranas y conservadas a 4°C.

c) El caldo MH se debe preparar según las directivas del fabricante, autoclavar y, antes de suplementar con los cationes, enfriar una noche a 4°C o en baño de hielo (si se necesita utilizar el mismo día). Los medios comerciales contienen pequeñas cantidades de calcio y magnesio, por lo tanto dichas cantidades se deben tener en cuenta en el momento de realizar los cálculos para suplementar el medio MH.

d) Agregando 0,1 ml de cada solución madre a 1 litro de caldo MH se incrementa en 1 mg/l la concentración de  $Ca^{++}$  y  $Mg^{++}$ . A este medio se lo denomina caldo Müeller Hinton suplementado con calcio y magnesio (CAMHB). Si el caldo MH provisto por el fabricante contiene las concentraciones correctas de calcio y magnesio (20-25 mg/l de  $Ca^{++}$  y 10-12.5 mg/l de  $Mg^{++}$ ), no es necesaria la suplementación.

4) Las características de cada lote de medio se evalúan utilizando cepas patrones de control de calidad (ver 12.3). Si al realizar las pruebas de sensibilidad con un lote nuevo de caldo MH, no se obtienen las CIMs esperadas para las cepas patrones, deben controlarse, tanto el contenido de cationes divalentes, como otras posibles variables de la prueba.

5) Para determinar si el medio es adecuado para probar la sensibilidad a sulfonamidas y trimetoprima, se debe realizar la CIM de estas drogas frente a *Enterococcus faecalis* ATCC® 29212. El punto final debe ser fácil de leer ( $\geq 80$  % de reducción en el desarrollo comparado con el control). El medio se considera adecuado si el valor de la CIM es  $\leq 0.5/9.5$   $\mu g/ml$ .

## 7.2. Preparación y almacenamiento de las diluciones

### 7.2.1. Método de Macrodilución en caldo

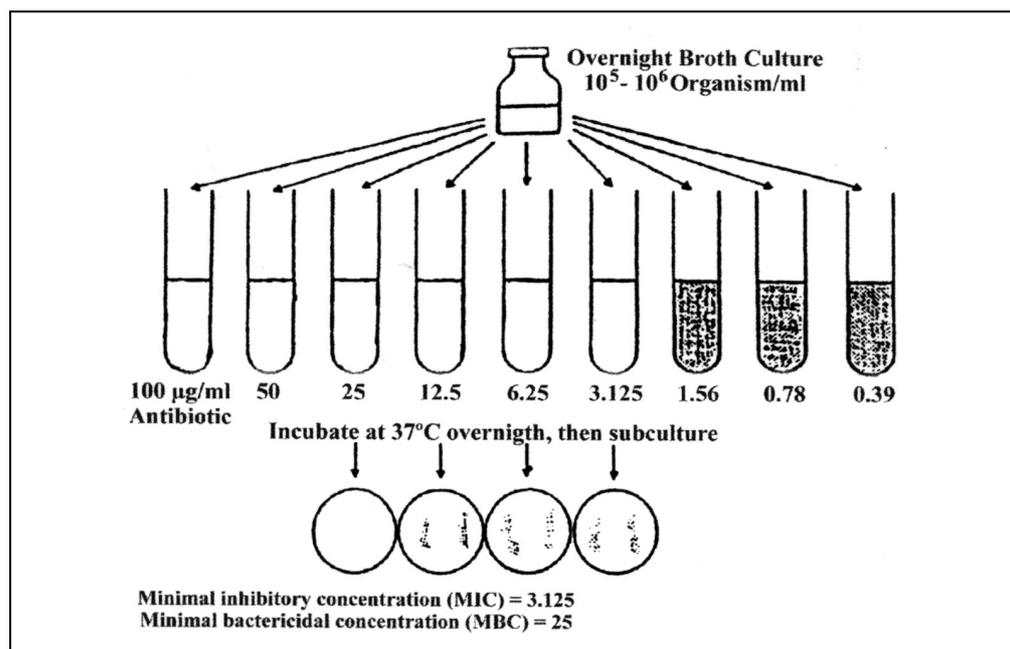
1) La prueba se realiza en tubo de hemólisis (13 x 100 mm) estériles

2) Para cada microorganismo ensayado se debe dejar, como control, un tubo que contenga caldo sin antibiótico.

3) Los tubos deben estar tapados con algodón ó tapas de plástico ó metal.

4) Preparar las sucesivas diluciones al medio del antibiótico en caldo (ver esquema en Tabla 6)  
6) El volumen final mínimo, requerido en cada tubo, es de 1 ml. Para medir todos los diluyentes y para agregar la solución de antibiótico al primer tubo se puede utilizar la misma pipeta. Para llevar a cabo cada dilución del rango se debe utilizar una nueva pipeta. Se debe tener en cuenta que con el agregado de la suspensión bacteriana, las concentraciones de antibiótico en cada tubo se diluirán al medio; por lo tanto dichas concentraciones deben ser preparadas al doble de la concentración final deseada.

## Esquema sugerido



## 7.2.2. Método de Microdilución en caldo

1) Este método se denomina microdilución porque involucra pequeños volúmenes de caldo. La prueba se realiza en policubetas de plástico estériles de fondo cónico o redondo, cada pocillo debe contener 0,1 ml de caldo. Las drogas pueden diluirse como se describe en la sección 7.2.1. o en la Tabla 6.

2) El método más conveniente para obtener las diluciones, consiste en prepararlas en un volumen de por lo menos 10 ml y colocar 0.1 (+/- 0.02) ml en cada uno de los 96 pocillos mediante un dispositivo mecánico (pipeta automática mono o multicanal). Si el inóculo se agrega con pipeta, como se describe en la sección 7.3.2.2., la solución de antibiótico se debe preparar de una concentración tal, que duplique la deseada y los pocillos deben ser cargados con 0.05 ml en vez de 0.1 ml. Cada policubeta debe incluir un pocillo de control de crecimiento (sin antibiótico), y un control negativo (caldo sin inocular).

3) Las policubetas, con las diluciones cargadas, se deben sellar inmediatamente después de preparadas en una bolsa de plástico y guardarse a -20° C (si es posible a una temperatura igual o menor que -60° C) hasta el momento de su utilización. La mayoría de los antibióticos conservados de esta manera se mantienen estables por varios meses pero algunos (por ej. ac.clavulánico, cefaclor, oxacilina, imipenem, etc.) pueden ser más lábiles por lo que deben almacenarse a una temperatura inferior a los -60° C. Las policubetas con las soluciones de antibiótico no deben ser guardadas en freezers autodescongelables y una vez descongeladas, no debe volver a congelarse, ya que este procedimiento deteriora rápidamente algunos antimicrobianos, particularmente los β-lactámicos.

## 7.3. Prueba de dilución en caldo

## 7.3.1. Preparación del inóculo

El inóculo estándar, tanto para macro como para microdilución en caldo, se puede obtener por crecimiento del microorganismo hasta una turbidez equivalente al tubo 0.5 de la escala de McFarland o por suspensión directa de colonias, en caldo o solución fisiológica, hasta alcanzar dicha turbidez (ver sección 5).

1) Una vez obtenido el inóculo de turbidez comparable al 0,5 de Mc Farland, diluir en caldo (macrométodo) ó en solución fisiológica o agua (micrométodo) para ajustar el inóculo de

manera tal, que luego de colocado, cada pocillo ó tubo contenga aproximadamente  $5 \times 10^5$  UfC/ml. La inoculación con la suspensión estandarizada debe hacerse dentro de los 15 minutos de preparada la misma, para evitar que el número de microorganismos aumente por duplicación. La concentración del inóculo ajustado puede variar dependiendo del método de inoculación utilizado y del microorganismo en estudio, por lo tanto se debe calcular para cada situación. Para realizar este cálculo se debe decidir el volumen exacto en el cual se va a realizar la inoculación. Por ejemplo, si el volumen final en cada pocillo es de 0.1 ml y el volumen de inóculo a agregar es de 0.005 ml, la concentración de la suspensión ajustada debe ser de  $1 \times 10^7$  UFC/ml. Por lo tanto se debe diluir 1/10 la suspensión bacteriana equivalente al patrón 0.5 de McFarland ( $1 \times 10^8$  UFC/ml). Cuando se colocan 0,005 ml de esta suspensión a cada pocillo con la solución de antibiótico se obtendrá una concentración de bacterias de aproximadamente  $5 \times 10^5$  UFC/ml (o  $5 \times 10^4$  UFC por pocillo si se trata del método de microdilución)

2) Para evaluar la sensibilidad de *Haemophilus* spp., prepare una suspensión del microorganismo en caldo M. Hinton o solución fisiológica, directamente a partir de una placa de agar chocolate de 24 horas, resuspendiendo tantas colonias como sean necesarias para alcanzar la turbidez equivalente al patrón 0.5 de McFarland. La concentración precisa del microorganismo en la suspensión inicial dependerá de las condiciones de incubación del cultivo, por ejemplo: una suspensión 0,5 de Mc Farland de *H.influenzae* preparada a partir de una placa de agar chocolate de 16 a 18 horas de incubación contendrá  $3-4 \times 10^8$  UfC/ml, mientras que si se parte de una placa de 24 hs. de incubación la concentración sería aproximadamente de  $1 - 2 \times 10^8$  UFC/ml. En el caso de *Haemophilus* spp., los inóculos que superen  $5 \times 10^5$  UFC/ml, pueden conducir a valores de CIM superiores a los reales con algunas cefalosporinas, particularmente en el caso de cepas productoras de  $\beta$ -lactamasas.

3) Para los estreptococos, particularmente *Streptococcus pneumoniae*, el inóculo se debe preparar en caldo Mueller-Hinton o solución fisiológica, resuspendiendo colonias provenientes de una placa de agar sangre de oveja con 18-20 horas de incubación. Esta suspensión se debe ajustar cuidadosamente a la turbidez correspondiente al patrón 0.5 de la escala de McFarland.

(4) Periódicamente se deben realizar recuentos de colonias para verificar que la concentración del inóculo final obtenido rutinariamente por el laboratorio se aproxime a  $5 \times 10^5$  UFC /ml para E. coli ATCC 25922. Esto se puede realizar fácilmente tomando alícuotas de 0,01 ml del pocillo o del tubo control de crecimiento inmediatamente después de la inoculación y diluirlos en 10 ml (dilución 1:1000) de solución fisiológica (9 g/lit de NaCl). Después de homogeneizar, se toma una alícuota de 0.1 ml y se distribuye sobre la superficie de una placa de agar con un medio apropiado para el desarrollo bacteriano; se incuba una noche y la presencia de 50 colonias indica que la densidad de inóculo final fue de  $5 \times 10^5$  UFC/ml.

### 7.3.2. Colocación del inóculo en los tubos o pocillos

#### 7.3.2.1. Macrodilución en caldo (tubos)

Se agrega 1 ml del inóculo estandarizado a cada tubo de dilución de antibiótico y al tubo control de crecimiento y se homogeneiza la mezcla. No deben transcurrir más de 15 minutos entre la preparación del inóculo y su colocación en el tubo. Se debe tener en cuenta que tanto el antimicrobiano, como el inóculo sufrirán una dilución al medio. Es aconsejable realizar un control de pureza del inóculo subcultivando una alícuota en un medio sólido no selectivo.

### 7.3.2.2. Microdilución en caldo (pocillos)

La aplicación del inóculo se debe realizar dentro de los 15 minutos posteriores a su ajuste. Cada pocillo se inocula utilizando algún dispositivo, por ejemplo, pipeta automática mono o multicanal. El volumen de suspensión bacteriana agregado no debe exceder el 10 % del volumen total del pocillo (por ej.  $\leq 10 \mu\text{l}$  de inóculo en 0.1 ml de la solución de antibiótico). Si el volumen de inóculo agregado es de 0,05 ml (dentro del pocillo con 0,05 ml de las diluciones del antibiótico), se obtiene como resultado una dilución al medio de la solución de antibiótico y del inóculo como sucede en el método de macrodilución. Esto se debe tener en cuenta al preparar el tanto el inóculo como el rango de diluciones; en ambos casos las concentraciones deberán duplicar la final deseada. Al igual que para macrodilución, es aconsejable realizar un control de pureza del inóculo subcultivando una alícuota en un medio sólido no selectivo.

Al finalizar la prueba, se debe sellar cada policubeta con tapa plástica, película plástica autoadhesiva o en una bolsa de plástico para evitar la desecación.

### 7.3.3. Incubación

El tiempo de incubación para la mayoría de los microorganismos es de 16 a 20 hs, tanto para la técnica de macro como de microdilución. En el caso de *Haemophilus* spp. y *Streptococcus*, la prueba se debe incubar 20 - 24 horas. Cuando se evalúa la sensibilidad de estafilococos y enterococos a oxacilina y vancomicina, respectivamente, se debe prolongar la incubación a 24 horas (ver Sección 9.1 y 9.2). Para mantener una temperatura de incubación uniforme, se recomienda no apilar más de cuatro policubetas.

### 7.3.4. Lectura de los resultados

La CIM es la menor concentración de antibiótico capaz de inhibir completamente el desarrollo bacteriano en el tubo o pocillo, el punto final queda definido a simple vista por la falta de turbidez del caldo. Alternativamente para la lectura y registro de resultados del método de microdilución se puede utilizar un dispositivo lector que pueda discernir entre desarrollo y ausencia del mismo. Para determinar el punto final de desarrollo, debe compararse cada tubo o pocillo con el tubo o pocillo control de crecimiento. El ensayo se considera válido si en el pocillo control de crecimiento se observa un botón de crecimiento  $\geq 2$  mm de diámetro o turbidez neta. Cuando se evalúa la sensibilidad a trimetoprima y sulfonamidas se puede observar un leve crecimiento como consecuencia de sustancias antagonistas del medio. En estos casos el punto final se define como la concentración en la cual hay una reducción en el crecimiento  $\geq 80$  % comparada con el control del crecimiento. Cuando en una prueba de microdilución se obtiene un pocillo salteado, se debe leer la CIM mas alta. Si apareciera más de un pocillo salteado con alguna droga, esta no se debería informar. Para bacilos gram (-) las CIMs obtenidas por el micrométodo tienden a ser las mismas ó una dilución menor a las obtenidas por el macrométodo (9).

## 8.0 MICROORGANISMOS CON EXIGENCIAS NUTRICIONALES ESPECIALES

El medio MH descrito anteriormente para patógenos aeróbicos de rápido crecimiento, no es adecuado para las pruebas de sensibilidad de microorganismos con exigencias nutricionales especiales. Si se quiere obtener la CIM de alguno de estos microorganismos, se deben adecuar tanto el medio de cultivo, como las cepas de control de calidad y los criterios de interpretación utilizados. La utilización en las pruebas de dilución de: *Haemophilus* test medium (HTM) para *H. influenzae*, medio base GC para *N. gonorrhoeae*, y caldo MH ajustado con cationes y suplementado con sangre lisada de caballo para *S. pneumoniae*, mostraron buenos resultados. Es importante que el inóculo para estas tres especies bacterianas se prepare directamente de una placa "over night" (ver sección 5). Tanto los medios de cultivo como los aspectos técnicos para realizar las pruebas de sensibilidad a varios microorganismos nutricionalmente exigentes como *Listeria* spp., *Neisseria meningitidis* y *Helicobacter pylori*, están descritos en la Tabla 2J y Tabla 7.

## 9.0 MICROORGANISMOS PROBLEMA

### 9.1. Detección de Resistencias en *Staphylococcus* spp.

#### 9.1.1. Resistencia a meticilina u oxacilina

La resistencia a las penicilinas antiestafilococcicas resistentes a las  $\beta$ -lactamasas se ha denominado históricamente meticilino resistencia. Es por eso que las siglas “MRSA” (methicillin-resistant *S. aureus*) o “MRS” (Methicillin-resistant staphylococci) se siguen utilizando aunque la meticilina ya no sea la droga de elección para la determinación de la sensibilidad o para el tratamiento. En este documento, cuando nos refiramos a la resistencia a estas drogas, vamos a utilizar distintos términos, por ej. “MRS”, “meticilino resistencia” u “oxacilino resistencia”.

En la actualidad algunos laboratorios continúan teniendo inconvenientes para la detección de MRS. Para mejorar la detección de estas cepas, se deben considerar los siguientes puntos:

- a) Para detectar la meticilino resistencia se debe utilizar oxacilina, que es más adecuada que la meticilina o la nafcilina para este fin.
- b) Para probar la sensibilidad a las penicilinas resistentes a penicilinasas (p. ej. oxacilina), tanto en las pruebas de dilución en agar como en caldo (ver Tabla 2C), se recomienda agregar al medio de cultivo CINA 2% p/v.
- c) El inóculo debe prepararse usando el método directo a partir de una placa de 24 horas (ver Sección 5.3.) y no el de crecimiento (Ver Sección 5.2.).
- d) Las pruebas para la detección de meticilino resistencia se deben incubar a una temperatura de 33-35°C (no superior a 35°C) por un total de 24 hs (más que de 16-20 hs).
- e) Los microbiólogos deben tener en cuenta que los estafilococos meticilino resistente son frecuentemente resistentes a otros antibióticos, incluyendo otros  $\beta$ -lactámicos, aminoglucósidos, macrólidos, clindamicina y tetraciclina. La observación de múltiple resistencia debe alertarnos sobre la posibilidad de meticilino resistencia.
- f) Cuando el resultado de la CIM es dudoso con respecto a la posible meticilino-resistencia de un *Staphylococcus* spp. se recomienda realizar una prueba confirmatoria adicional como el “Screening” en placa suplementada con CINA 2% p/v (descrito en la Tabla 2C).
- g) Tanto *S. aureus* como *Staphylococcus* coagulasa negativa meticilino resistentes, deben informarse resistentes a todos los cefemes y otros  $\beta$ -lactámicos tales como ampicilina / sulbactam, amoxicilina / clavulánico, ticarcilina / clavulánico, piperacilina / tazobactam e imipenem, independientemente del resultado de sensibilidad “in vitro”. Esto se debe a que hay muchos casos documentados de pobre respuesta al tratamiento de *Staphylococcus* meticilino resistentes (MRSA) con estas drogas y además no hay datos clínicos sobre la eficacia del tratamiento de los MRSA con los  $\beta$ -lactámicos enumerados.

#### 9.1.2. Placa de “screening” de oxacilina

Además de los métodos de dilución descritos anteriormente, puede usarse para detectar meticilino resistencia, una placa de oxacilina suplementada con CINA. La prueba se lleva a cabo por inoculación, en estría o “spot”, del estafilococo aislado sobre una placa de agar Mueller Hinton con 6  $\mu$ g/ml de oxacilina, suplementado con 4% p/v de CINA. La inoculación debe hacerse mediante un hisopo de algodón previamente sumergido en una suspensión bacteriana de turbidez equivalente al estándar 0,5 de Mc Farland. Esta se obtiene a partir de colonias aisladas en medio sólido. Incubar las placas a una temperatura no superior a 35°C. Luego de incubar 24hs, se debe examinar la placa cuidadosamente (utilizando luz transmitida) con el objeto de detectar pequeñas colonias (> de una colonia) o una tenue película de crecimiento. La observación de alguno de estos tipos de desarrollo es indicativo de oxacilino resistencia (10) (ver Tabla 2C).

### 9.1.3. Sensibilidad reducida a vancomicina

En la literatura se han descrito cepas de estafilococos coagulasa negativa con CIMs, para teicoplanina y vancomicina, intermedias o resistentes (11, 12). El primer hallazgo de cepas de *S. aureus* con sensibilidad disminuida a vancomicina (CIMs 4-8 µg/ml) fue en Japón, en el año 1997 (13). Posteriormente se describieron aislamientos con esta característica en Estados Unidos y Francia (14). Aún no se conoce con exactitud el mecanismo que provoca el aumento de las CIMs, pero se cree que involucra alteraciones en la pared celular e hiperexpresión de proteínas ligadoras de penicilina (PBPs). Hasta la fecha todos estos aislamientos de *S. aureus* parecen provenir de MRSA.

La metodología sugerida para detectar este tipo de cepas es la CIM. También puede utilizarse la prueba de “screening” de vancomicina en agar recomendada para enterococos (15) que mostró resultados satisfactorios incubando la placa 24 hs. a 35°C. La especificidad del ensayo se asegura utilizando como control negativo el *S. aureus* ATCC 29213. Hasta que se conozcan los datos de prevalencia o significado clínico de estos aislamientos, los laboratorios pueden elegir examinar cuidadosamente los MRSA para detectar elevaciones en la CIM para vancomicina.

## 9.2. Detección de resistencia en *Enterococcus* spp.

### 9.2.1. Resistencia a Penicilina/Ampicilina

Los enterococos pueden ser resistentes a penicilina y ampicilina debido a la producción de proteínas ligadoras de penicilinas (PBPs) de baja afinidad ó a la producción de β-lactamasas. Este último mecanismo de resistencia es mucho menos común. Las pruebas de dilución en agar o en caldo detectan satisfactoriamente los aislamientos con PBPs alteradas, pero no son efectivas para detectar las cepas productoras de β-lactamasas (16). Para la correcta detección de β-lactamasas en este género se debe utilizar la prueba de nitrocefín (ver Sección 10). Algunos aislamientos de enterococos pueden presentar alto nivel de resistencia a ampicilina y penicilina (por ej. CIMs ≥ de 128 µg/ml). Se recomienda determinar la CIM de todos los aislamientos de enterococos provenientes de líquido cefalorraquídeo o sangre. Esto se debe a que las cepas de *Enterococcus faecium* con bajo nivel de resistencia (CIMs de penicilina ≤ 64 µg/ml o ampicilina ≤ 32 µg/ml) se deben considerar potencialmente sensibles a la sinergia con un aminoglucósidos (en ausencia de alto nivel de resistencia a este último). En cambio en las cepas que muestran alto nivel de resistencia a penicilina o ampicilina, la sinergia no se produce (17, 18).

### 9.2.2. Resistencia a Vancomicina

Para la correcta detección de la resistencia a vancomicina en enterococos por los métodos de dilución en caldo o en agar, se requiere una incubación de 24 hs. y además las placas, tubos o pocillos deben examinarse cuidadosamente para detectar la presencia de cualquier fino crecimiento. También se puede usar la prueba de “screening” en agar descrita en la Tabla 2D.

### 9.2.3. Alto nivel de resistencia a aminoglucósidos

El alto nivel de resistencia a los aminoglucósidos en enterococos predice la ausencia de sinergia bactericida de penicilina o glicopéptidos con estas drogas (16). Para detectar este tipo de resistencia se puede usar agar o caldo con alta concentración de gentamicina (500 µg/ml) o estreptomina (1000 µg/ml para caldo o 2000 µg/ml para agar) (ver Tabla 2D). No es necesario probar otros aminoglucósidos porque sus actividades sobre el enterococo no son superiores a las de gentamicina o estreptomina. En la Tabla 2D se presentan los controles de calidad para estas pruebas.

### 9.3. Detección de $\beta$ -lactamasas de espectro extendido en bacilos gram negativos

Las  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEEs) son enzimas que resultan generalmente de las mutaciones en los genes de las  $\beta$ -lactamasas plasmídicas comunes como TEM-1, TEM-2 y SHV-1. Las BLEEs pueden conferir resistencia a: cefotaxima, ceftazidima, aztreonam, penicilinas de espectro extendido y otros  $\beta$ -lactámicos estructuralmente relacionados, en aislamientos clínicos de *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Escherichia coli*, y otros géneros de la familia Enterobacteriaceae que son generalmente sensibles a estos agentes (19). Algunas  $\beta$ -lactamasas confieren alto nivel de resistencia a uno o más de estos antibióticos y los microorganismos que las producen, son fácilmente reconocidos como resistentes o intermedios por la prueba de CIM. Otras en cambio confieren modestos niveles de resistencia, que muchas veces superan el valor normal de las cepas sensibles pero no el punto de corte establecido. Estas generalmente se detectan ensayando varios antibióticos  $\beta$ -lactámicos (ver Tabla de BLEEs al final de la Tabla 2A).

Teniendo en cuenta lo dicho anteriormente, en los aislamientos clínicos de *Klebsiella* spp. y *E.coli* con valores de CIM aumentados para cefpodoxima, ceftazidima, aztreonam, cefotaxima o ceftriaxona se debe sospechar la presencia de BLEEs. Las CIMs de los microorganismos productores de BLEEs deben disminuir si se agrega ácido clavulánico (ver Tabla de BLEEs al final de la Tabla 2A). Cualquier enterobacteria productora de BLEE debe ser informada como resistente a todas las penicilinas, cefalosporinas y aztreonam, independientemente de su sensibilidad “in vitro”. Las recomendaciones para la detección, confirmación e informe de BLEEs se presentan en la Tabla 1 y Tabla 2A.

## 10.0 DETERMINACION DE $\beta$ -LACTAMASAS

### 10.1. Propósito

Para *Haemophilus* spp., *N. gonorrhoeae* y *Moraxella catarrhalis* una prueba rápida de  $\beta$ -lactamasa da información clínica relevante, acerca de la sensibilidad, más prontamente que la CIM; además es el único método confiable para detectar la producción de este tipo de enzimas en *Enterococcus* spp. También puede confirmar la sensibilidad a penicilina determinadas por CIM, especialmente de las cepas "borderline" (CIM entre 0.06 y 0.25  $\mu\text{g/ml}$ ) de *Staphylococcus* spp.

Una prueba positiva de  $\beta$ -lactamasa predice:

- Resistencia a penicilina, ampicilina y amoxicilina para aislamientos de *Haemophilus* spp., *N. gonorrhoeae* y *Moraxella catarrhalis*.
- Resistencia a penicilinas, acilamino - penicilinas, carboxi -penicilinas, y ureido - penicilinas para aislamientos de estafilococos y enterococos.

Un resultado negativo de la prueba de  $\beta$ -lactamasa no descarta la resistencia a los  $\beta$ -lactámicos por otros mecanismos.

No se debe realizar esta prueba a las enterobacterias, *Pseudomonas* spp. y otros bacilos gram negativos aeróbicos, ya que el resultado no predice la sensibilidad a los  $\beta$ -lactámicos de uso común en clínica.

### 10.2. Elección de la prueba de $\beta$ -lactamasas

Las pruebas que utilizan nitrocefín dan resultados confiables para *Haemophilus* spp., *N. gonorrhoeae*, *Moraxella catarrhalis*, estafilococos y enterococos (20). El método acidimétrico es útil para *Haemophilus* spp., *N. gonorrhoeae* y estafilococos. El método iodométrico se puede utilizar para *N. gonorrhoeae*. Para *Moraxella catarrhalis* solamente nitrocefín da resultados aceptables (21). Para una correcta detección de  $\beta$ -lactamasa en *Staphylococcus aureus* muchas veces es necesario inducir la producción de la enzima e incubar la prueba no menos de 1 hora. Se aconseja realizar la prueba sobre el cultivo que se encuentra en el borde del halo de oxacilina (que es un buen inductor de la producción de  $\beta$ -lactamasas). Para asegurar los resultados de todos estos métodos es indispensable probar, conjuntamente con la cepa clínica, un control positivo y un control negativo.

## 11.0 INFORME DE LOS RESULTADOS

Al médico se le puede informar directamente el valor de la CIM pero es importante para que haya una buena comprensión del dato por parte de todos los médicos, que dicho valor se acompañe de la correcta categoría de interpretación.

Para la mayoría de los agentes antimicrobianos éstas categorías se desarrollaron determinando la CIMs de un gran número de aislamientos, incluyendo aquellos con mecanismos de resistencia clínicamente relevantes para cada particular clase de drogas. Además se tuvieron en cuenta las propiedades farmacocinéticas de la droga en las dosificaciones convencionales y por último se consideraron, cuando fue posible, los estudios de eficacia clínica en el tratamiento de patógenos específicos (22).

### 11.1. Sensible

Ver M2 – A6, 8.2.1. (Prueba de difusión por discos).

### 11.2. Intermedio

Ver M2 – A6, 8.2.2. (Prueba de difusión por discos).

### 11.3. Resistente

Ver M2 – A6, 8.2.3. (Prueba de difusión por discos).

## 12.0 PROCEDIMIENTOS PARA EL CONTROL DE CALIDAD

### 12.1. Propósito

Los objetivos del programa de control de calidad son asistir en la vigilancia de:

- ✓ La precisión y exactitud de los procedimientos para la evaluación de la sensibilidad bacteriana a los antimicrobianos.
- ✓ El comportamiento de los reactivos usados
- ✓ El desempeño de quienes realizan las pruebas y leen los resultados.

Estos objetivos se cumplen, en general, ensayando las cepas de control de calidad de sensibilidad antimicrobiana conocida, pero no se limita sólo a eso.

### 12.2. Responsabilidades del control de calidad

Los laboratorios modernos se apoyan fuertemente en los fabricantes de productos farmacéuticos y diagnósticos para la adquisición de medios, reactivos y sistemas para la determinación de la sensibilidad a los antimicrobianos. Aunque esta sección está dirigida al control de calidad de los procedimientos estándar de referencia, se puede aplicar además a algunos sistemas comerciales que se basan, al menos en parte, en estos métodos.

Presentamos a continuación una distribución lógica de responsabilidades:

- Fabricantes (productos comerciales o hechos en el laboratorio):
  - ✓ Estabilidad de los antibióticos
  - ✓ Identificación de los antibióticos
  - ✓ Potencia de las soluciones madre de los antimicrobianos
  - ✓ Cumplimiento del sistema de calidad recomendado para los productos

- Laboratorio: (usuario)
  - ✓ Almacenamiento correcto de las drogas (para prevenir el deterioro)
  - ✓ Pericia del personal que realiza las pruebas de sensibilidad
  - ✓ Observación de los procedimientos que indican las normas (por ej. condiciones de incubación, preparación del inóculo, interpretación del punto final).

Las empresas productoras deberían recomendar programas de control de calidad que permitan al usuario evaluar las variables de la prueba (por ej.: densidad del inóculo, condiciones de envío y almacenaje) que generalmente causan problemas y para determinar si la prueba se esta haciendo de la manera correcta cuando se siguen las instrucciones de un protocolo establecido.

### 12.3. CEPAS DE REFERENCIA PARA CONTROL DE CALIDAD

- a) La cepa de referencia ideal para control de calidad de los métodos de dilución debe tener una CIM cercana al centro del rango de las diluciones ensayadas para todos los antibióticos. Por ej. una cepa de control de calidad ideal se debe inhibir en la cuarta de una serie de siete diluciones, pero debe considerarse aceptable si se inhibe en la tercera o la quinta dilución. Algunas veces, en particular cuando se prueban nuevos y más potentes antibióticos, puede ser necesario probar cepas de control de calidad adicionales para obtener valores dentro de la escala ensayada.
- b) Cuando se prueban por este método tres o menos diluciones al medio de un antimicrobiano, se debe modificar el método de control de calidad. Una alternativa es usar como control un microorganismo con una CIM modal para la droga que sea igual a la menor concentración probada, o no menor que una dilución al medio por debajo de la misma y otro con una CIM modal igual a la concentración mas alta probada o no mayor que una dilución al medio por encima de dicha concentración. Para que el control de calidad sea aceptable, al menos una de las dos cepas debe estar dentro del rango ensayado. Para los usuarios de sistemas comerciales esta estrategia se puede utilizar para probar selectivamente las drogas menos estables incluidas en los paneles (por ej.: meticilina, imipenem, cefaclor, combinaciones con ácido clavulánico, etc.).

Las cepas de control de calidad utilizadas para el método de dilución en medio sólido o líquido son las mismas que se utilizan para el método de difusión por discos (23), sin embargo *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923 es de poca utilidad en las pruebas de dilución por su alta sensibilidad a la mayoría de los antibióticos, por lo tanto se reemplaza por el *Staphylococcus aureus* ATCC® 29213 que es una cepa débilmente productora de  $\beta$ -lactamasa. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 27853, después de sucesivos repiques en el laboratorio, desarrolla resistencia a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos, para evitar este problema periódicamente, o cuando se observe la resistencia, se debe desechar la cepa en uso y reemplazarla por un nuevo repique del cultivo almacenado. Mientras no exista un perfecto grupo de cepas para control de calidad, las de utilidad probada para las pruebas de sensibilidad por dilución son las siguientes (Ver además Tablas 3 y 3A):

- E. coli ATCC® 25922
- E. coli ATCC® 35218
- P. aeruginosa ATCC® 27853
- S. aureus ATCC® 29213
- S. aureus ATCC® 43300
- E. faecalis ATCC® 29212

- *E. faecalis* ATCC® 51299
- *H. influenzae* ATCC® 49247
- *H. influenzae* ATCC® 49766
- *Neisseria gonorrhoeae* ATCC® 49226
- *Streptococcus pneumoniae* ATCC® 49619
- *Helicobacter pylori* ATCC® 43504
- *Klebsiella pneumoniae* ATCC® 700603

*E. coli* ATCC® 35218 se utiliza sólo como microorganismo control cuando se prueban combinaciones de  $\beta$ -lactámicos e inhibidores de  $\beta$ -lactamasas tales como las que contienen ácido clavulánico, sulbactam o tazobactam.

*Staphylococcus aureus* ATCC® 43300 y ATCC® 29213 se usan como control positivo y negativo, respectivamente, para la placa de “screening” de oxacilina (ver Tabla 2C). *Enterococcus faecalis* ATCC® 51299 y ATCC® 29212 se usan como microorganismos control para las pruebas de “screening” de resistencia de alto nivel a los aminoglucósidos y vancomicina (ver Tabla 2D).

*Klebsiella pneumoniae* ATCC® 700603 se utiliza como control en las pruebas de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (ver Tabla 2A)

#### 12.4. Conservación de las cepas de control de calidad

a) Las cepas de control de calidad se deben probar con los procedimientos estándar descritos en esta norma utilizando los mismos materiales y métodos que se utilizan para las cepas clínicas.

b) Para conservar estas cepas por tiempos prolongados es conveniente colocarlas en congeladores a una temperatura  $\leq$  que  $-20^{\circ}\text{C}$  (preferiblemente a  $-60^{\circ}\text{C}$  o en tanque de nitrógeno líquido, si se dispone de ellos), utilizando estabilizadores adecuados (por ej.: suero fetal bovino al 50% en caldo, caldo tripticasa soja con 10 a 15% de glicerol, sangre desfibrinada de oveja o leche descremada). La liofilización es también un buen método de conservación que no altera la sensibilidad bacteriana a los antibióticos.

c) Las cepas para trabajo diario se deben conservar entre  $4$  y  $8^{\circ}\text{C}$  en estrías de agar tripticasa soja (microorganismos comunes) o de agar chocolate enriquecido (microorganismos nutricionalmente exigentes) y repicarlas semanalmente. Los cultivos de trabajo se deben reemplazar por lo menos una vez al mes, a partir de la cepa congelada ( $-20^{\circ}\text{C}$ ,  $-70^{\circ}\text{C}$  o nitrógeno líquido), liofilizada o de cultivo comerciales.

d) Antes de ser probadas las cepas se deben subcultivar en un medio sólido con el fin de obtener colonias aisladas. Tanto los aislamientos liofilizados como los congelados se deben repicar dos veces antes de ser usados.

e) Para realizar pruebas de control de calidad, el inóculo bacteriano se debe preparar de acuerdo a las recomendaciones de este manual.

f) Las cepas patrones de control de calidad se pueden utilizar para comprobar la precisión y la exactitud de las pruebas de dilución, a no ser que haya cambios significativos en la CIM que no puedan ser atribuidos a fallas metodológicas. Si aparecen resultados inexplicables que sugieran un cambio en la sensibilidad de la cepa patrón, se debe obtener un nuevo cultivo a partir de la cepa almacenada.

## 12.5. Control de lotes

- 1) Pruebe cada lote de tubos (macrodilución), policubetas (microdilución) o placas (medio sólido) con la cepa de referencia apropiada. Si la CIM obtenida no está dentro del rango esperado (ver Tabla 3 y 3A), el lote debe ser descartado.
- 2) Se debe incubar "over night" al menos un tubo, pocillo o placa de agar, sin inocular, de cada lote, para asegurar la esterilidad del medio.
- 3) Cada lote de caldo MH debe ser controlado en cuanto a su contenido de cationes divalentes. Determine para ello, la CIM a gentamicina para *P. aeruginosa* ATCC® 27853 en caldo no suplementado y compare los resultados con el rango esperado (ver Tabla 3). Si la CIM obtenida está por debajo del rango esperado, suplemente el caldo con  $\text{Ca}^{++}$  y  $\text{Mg}^{++}$  como se indica en la Sección 7.1. Se puede verificar el contenido de cationes del agar MH, colocando un disco de gentamicina 10 µg sobre una placa inoculada con *P. aeruginosa* ATCC® 27853, como se describe en el documento M2 de difusión por discos del NCCLS (23). Si el medio contiene la cantidad adecuada de  $\text{Ca}^{++}$  y  $\text{Mg}^{++}$ , el diámetro de la zona de inhibición obtenida debe estar dentro del rango esperado.
- 4) Se deben llevar registros de los números de lote de cada uno de los reactivos y materiales empleados para la realización de las pruebas de sensibilidad

## 12.6. Límites de control de calidad para la CIM

Los límites de control de calidad aceptables de la CIM para una prueba de control de calidad (combinación de droga/microorganismo) se presentan en las Tablas 3 y 3A. El comportamiento del sistema de prueba se debe vigilar utilizando esos límites, ensayando cada día que se realice la prueba la cepa control apropiada. Si se documenta un comportamiento satisfactorio (ver Sección 12.7.2) se puede pasar al control semanal (ver abajo).

## 12.7. Frecuencia del control de calidad (también referirse al apéndice A)

La opción de aplicar el control de calidad semanal, mostrada más abajo, es válida sólo si el laboratorio utiliza el método de dilución rutinariamente para la determinación de la sensibilidad antimicrobiana. Si el laboratorio utiliza esta metodología infrecuentemente, el ensayo de las cepas patrones debe hacerse cada vez que se pruebe un aislamiento clínico.

### 12.7.1. Prueba diaria

Cuando la prueba de control de calidad se realiza diariamente, para cada combinación agente/microorganismo, sólo uno de cada 20 ensayos puede estar fuera de los rangos aceptables (basado en un límite de confianza del 95%). En general para una serie de 20 CIMs consecutivas, 2 o más resultados fuera del rango aceptable debería llevar a una corrección en el procedimiento.

### 12.7.2. Prueba semanal

#### 12.7.2.1. Pasaje de la prueba diaria a la prueba semanal (demostración de adecuado comportamiento)

Cada vez que se realice una prueba, debe ir acompañada de una cepa de referencia apropiada para controlar los posibles errores metodológicos. Sin embargo la frecuencia de las pruebas de control de calidad se puede reducir si el laboratorio puede documentar resultados satisfactorios con los controles de calidad diarios. Se define como resultados satisfactorios a lo siguiente:

- Pruebe todas las cepas de control de calidad correspondientes diariamente, por el término de 30 días y documente los resultados.

- Para pasar de control diario a semanal, no más de tres de los 30 valores de CIM obtenidos diariamente se pueden encontrar fuera de los rangos aceptables para cada combinación droga-microorganismo enumerados en las Tabla 3 y 3A.

#### **12.7.2.2. Implementación del control de calidad semanal**

- Se puede pasar al control de calidad semanal sólo cuando se ha documentado un comportamiento satisfactorio de control de calidad diario (ver Sección 12.7.2.1).
- Continuar con el control de calidad una vez por semana y cuando se cambie algún reactivo involucrado en el procedimiento (por ej. nuevo lote de caldo del mismo fabricante)
- Si alguno de los controles de calidad semanales está fuera del rango aceptable se requiere una acción correctiva (ver Sección 12.8.)
- Si se adiciona un nuevo agente antimicrobiano o se utiliza caldo de otro fabricante, debe ser probado por 30 días consecutivos y se debe documentar el correcto comportamiento, previamente a que este se pueda controlar semanalmente. Además se requiere la prueba de 30 días consecutivos si se realiza un cambio importante en el método para leer los resultados, como por ejemplo pasar de lectura visual a la utilización de un instrumento.
- Estas recomendaciones también se pueden utilizar para probar sistemas en los cuales la CIM se determina utilizando tres o menos concentraciones adyacentes de agente antimicrobiano.
- Los resultados del control de calidad para algunas drogas de degradación rápida pueden indicar la necesidad de realizarlo más frecuentemente que una vez a la semana (ver Sección 6.2.1 y 7.2.2).
- Como las pruebas de “screening” para algunas situaciones especiales no se realizan de rutina, se recomienda que el control de calidad con las cepas apropiadas, en estos casos se haga cada día que se realice el “screening”

### **12.8. Acciones correctivas**

#### **12.8.1. Resultados fuera de los rangos aceptables por un error obvio**

Si hay una razón obvia para que un resultados se escape de los rangos aceptables como:

- Uso de la cepa control incorrecto,
  - Clara contaminación de la cepa o el medio o
  - Uso inadvertido de condiciones o temperatura de incubación incorrectas.
- Se debe documentar la razón y volver a probar la cepa el mismo día que se detecta el error. Si el resultado de la repetición está dentro de los rangos aceptables, no se requiere ninguna otra acción correctiva.

#### **12.8.2. Resultados fuera de los rangos aceptables no debido a un error obvio**

##### **12.8.2.1. Acción correctiva inmediata**

Si no hay una razón obvia que justifique el resultado fuera de los rangos aceptables se debe tomar una acción correctiva inmediata.

- Probar la combinación droga/microorganismo involucrada desde el día en que se observa el error y vigilar por el término de 5 días consecutivos. Documentar todos los resultados.

- Si las cinco CIMs para la combinación droga/microorganismo están dentro de los rangos aceptables definidos en las Tablas 3 y 3A, no se necesita ninguna otra acción correctiva.
- Si algunas de las cinco CIMs permanece fuera del rango aceptable, se requiere una acción correctiva adicional (ver Sección 12.8.2.2.)
- Se debe continuar con el control diario hasta que se obtenga una resolución final del problema

#### **12.8.2.2. Acción correctiva adicional**

Cuando la acción correctiva inmediata no resuelve el problema es probable que se trate de un error sistemático más que un error al azar.

Se deben investigar las siguientes fuentes de error para verificar que:

- el estándar de turbidez no esté vencido, esté guardado correctamente, cumpla con los requerimientos (ver Sección 5.1.) y que haya sido correctamente mezclado antes de su uso
- todos los materiales utilizados no estuvieran vencidos y que fueron almacenados a la temperatura correcta
- la estufa de incubación tuviera la temperatura y la atmósfera adecuada
- estuvieron funcionando correctamente otros equipos utilizados como ejemplo las pipeteadores
- las placas fueron guardadas a la temperatura adecuada
- las cepas control no han cambiado ni se han contaminado
- las suspensiones del inóculo se han preparado y ajustado correctamente
- el inóculo para la prueba fue preparado a partir de una placa incubada el tiempo correcto y en ningún caso por más de 24 hs.

Puede ser necesario obtener una nueva cepa de control de calidad (del congelado o de una fuente confiable) y nuevos lotes de materiales posiblemente de distinto fabricante (incluyendo un nuevo estándar de turbidez). Si el problema parece estar relacionado con un determinado fabricante, éste debe ser contactado. Es útil en algunos casos intercambiar cepas de control de calidad y materiales con otro laboratorio que utilice la misma metodología. Por último, hasta que el problema sea resuelto puede ser necesario utilizar un método alternativo para evaluar la sensibilidad.

Una vez que el problema haya sido corregido, para volver al control de calidad semanal, se debe documentar el comportamiento satisfactorio de las pruebas de control por otros 30 días consecutivos (ver Sección 12.7.2.1.)

#### **12.9 Informe de los resultados clínicos cuando se obtienen resultados de control de calidad fuera de los rangos aceptables.**

Siempre que se obtenga un resultado fuera de los límites de control o cuando se necesite una acción correctiva, se debe hacer un análisis individual, considerando si la fuente de error, cuando es conocida, pudo haber afectado los resultados del paciente en forma significativa. Las opciones que se tienen son: suprimir el resultado del antibiótico en particular, revisar retrospectivamente los datos del paciente o los datos acumulados de perfiles de resistencia inusuales; y utilizar un método alternativo o un laboratorio de referencia hasta que el problema sea resuelto.

## 12.10. Otros procedimientos de control

### 12.10.1. Control de crecimiento

Toda prueba de sensibilidad por dilución debe incluir un tubo, pocillo o placa conteniendo el medio base sin antimicrobiano como control del crecimiento, para confirmar la viabilidad de la cepa. Para la prueba en medio líquido este control sirve para determinar, por comparación de turbidez, el valor de la CIM.

### 12.10.2. Control de pureza de inóculo

Luego de realizada la CIM, una muestra de cada inóculo se debe reaislar sobre una placa de agar. Examinar después de un a noche de incubación para detectar cultivo mixto. Esta placa servirá también como fuente de cultivo fresco si, por alguna razón, se necesita repetir la prueba. Este control es muy útil sobre todo cuando se utiliza la técnica de dilución en caldo, donde los cultivos mixtos son difíciles de detectar.

### 12.10.3. Control de la densidad de inóculo

Cada laboratorio debe realizar periódicamente recuentos de colonias sobre los inóculos ajustados al 0,5 de McFarland para verificar que la suspensión utilizada como estándar comparativo, así como la metodología de preparación y dilución de los inóculos se mantenga bajo control. Para esto inmediatamente después de inocular las pruebas, se deben tomar muestras de los tubos o pocillos del control de crecimiento y realizar el correspondiente recuento de viables. Si se utiliza dilución en agar, la muestra se debe tomar al azar de alguno de los reservorios de la cubeta del replicador.

### 12.10.4. Control de la Interpretación de los puntos finales

Para minimizar las posibles variaciones, entre distintos observadores, en la interpretación de los puntos finales de la CIM, dicha interpretación debe controlarse periódicamente. Para esto, se debe seleccionar un grupo de pruebas de dilución y todo el personal del laboratorio que realice la prueba seleccionada, debe leer independientemente el resultado. Todos los valores deben ser registrados y comparados con el valor obtenido por un lector experimentado. Para ser aceptables las lecturas realizadas por los distintos observadores deben tener entre ellas, una variación menor que  $\pm 1$  dilución (24).

## 13. LIMITACIONES DE LOS METODOS DE DILUCION

### 13.1. Grupos de microorganismos sobre los que se puede realizar pruebas de dilución

El método de dilución descrito en este documento ha sido estandarizado para patógenos de rápido desarrollo, estos incluyen *Staphylococcus* spp., *Enterococcus* spp., Enterobacteriaceae, *P. aeruginosa*, *Pseudomonas* spp., *Stenotrophomonas maltophilia*, *Acinetobacter* spp. y ha sido modificado para probar algunos microorganismos nutricionalmente exigentes como *Haemophilus* spp. (Tabla 2E) , *N. gonorrhoeae* (Tabla 2F), *Streptococcus* spp. (Tablas 2G y 2H) y *Helicobacter pylori* (Tabla 2J).

### 13.2. Resultados erróneos

Se pueden obtener resultados erróneos cuando se realiza pruebas de sensibilidad de algunas drogas y se reportan como sensibles frente a microorganismos específicos. Estas combinaciones incluyen, pero no están limitadas a las siguientes:

- cefalosporinas de 1<sup>era</sup> y 2<sup>da</sup> generación y aminoglucósidos frente a *Salmonella* spp. y *Shigella* spp;
- todos los antibióticos  $\beta$ -lactámicos (excepto oxacilina, meticilina y nafcilina) frente a *Staphylococcus* spp. meticilino resistentes;
- cefalosporinas, aminoglucósidos (salvo para detección de alto nivel de resistencia), clindamicina y trimetoprima/sulfametoxazol frente a enterococos; y
- cefalosporinas frente a *Listeria* spp.

### 13.3. Emergencia de resistencia

Algunos agentes antimicrobianos se asocian con emergencia de resistencia durante tratamientos prolongados. Es decir que, aislamientos que son inicialmente sensibles podrían transformarse en resistentes dentro de los tres a cuatro días posteriores a la iniciación de la terapia antimicrobiana. Esto ocurre más frecuentemente en *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp. y *Serratia* spp. con cefalosporinas de 3<sup>era</sup> generación; en *P. aeruginosa* con todos los antibióticos; y en *Staphylococcus* spp. con las quinolonas.

### 13.4 Medidas para el aseguramiento de la calidad

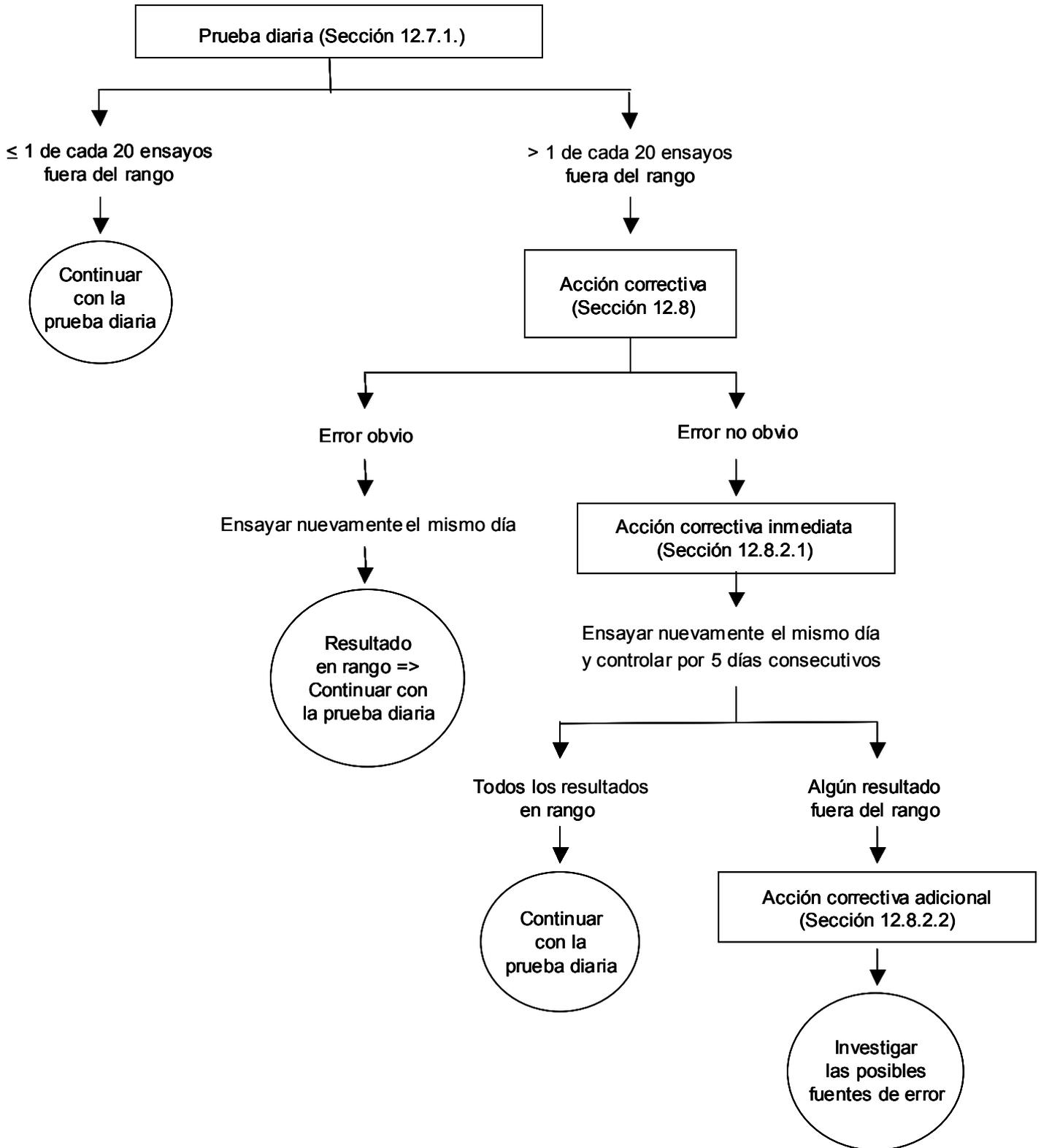
Si se siguen las indicaciones de este estándar, se controlan prácticamente todos los parámetros involucrados en las pruebas de dilución. La obtención de resultados satisfactorios con las cepas patrones de control de calidad no garantiza que se obtendrán también resultados satisfactorios con los aislamientos clínicos. Cuando se obtienen resultados inconsistentes o atípicos con los aislamientos clínicos, las pruebas de sensibilidad y/o la tipificación del microorganismo deben repetirse. Cada laboratorio debería desarrollar sus propias políticas respecto de la verificación de perfiles inusuales de resistencia a los antimicrobianos, particularmente los que tienen muchas probabilidades de tener impacto en el cuidado del paciente.

## 14.0 PRUEBAS DE "SCREENING"

Las pruebas de "screening" para resistencia a oxacilina en *Staphylococcus aureus* y alto nivel de resistencia a aminoglucósidos en enterococos dan resultados confiables, comparables a los que se obtienen por métodos de referencia y no necesitan ningún ensayo confirmatorio adicional. Las limitaciones para otras pruebas de "screening" como las utilizadas para detectar resistencia a vancomicina en enterococos (Tabla 2D) y BLEEs en algunas enterobacterias (Tabla 2A), junto con la necesidad de ensayos confirmatorios se presentan en las Tablas individuales correspondientes.

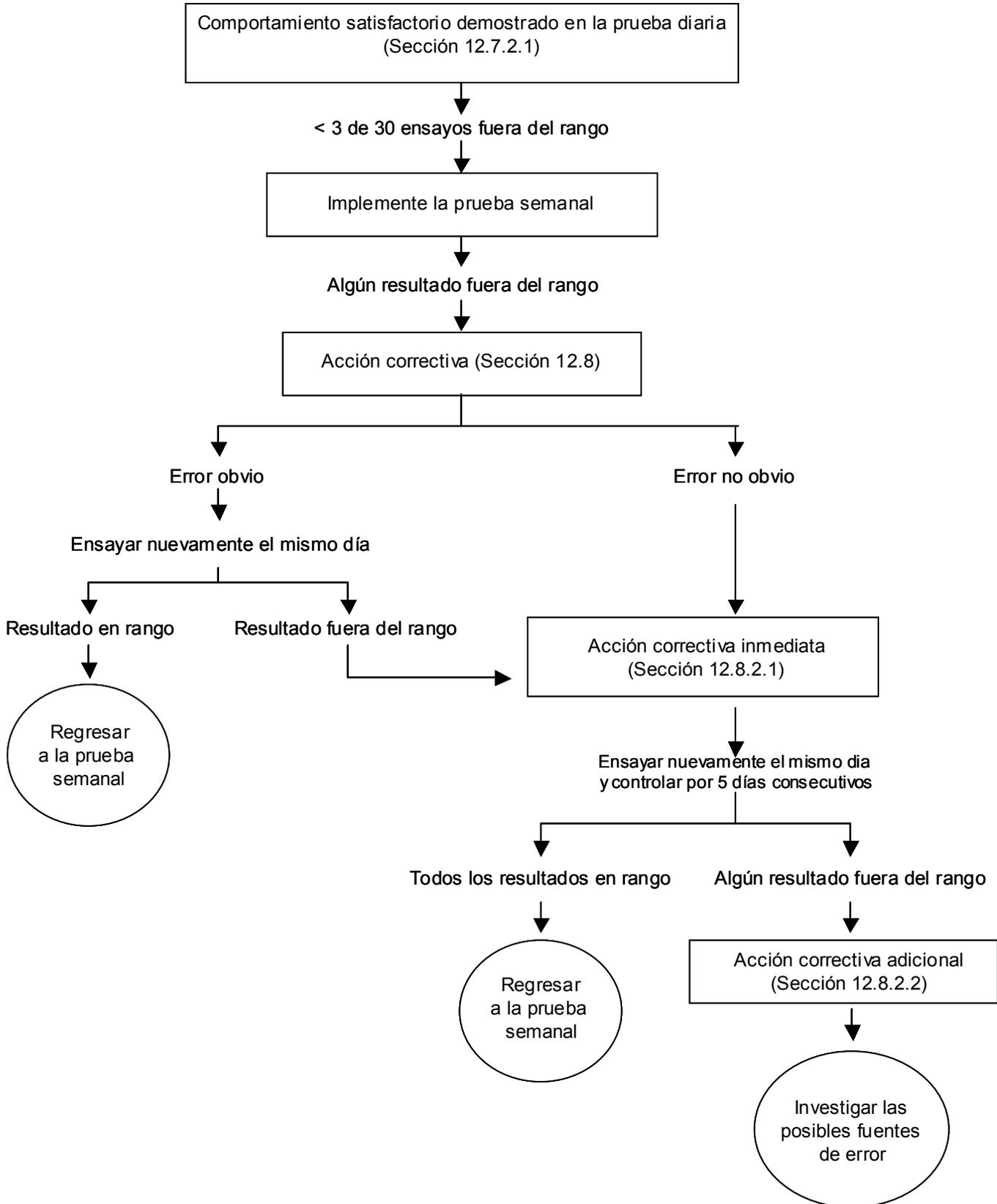
APENDICE A. DIAGRAMA DE FLUJO DE LOS PROTOCOLOS DE CONTROL DE CALIDAD

Protocolo de control de calidad diario para las pruebas de dilución aeróbica



APENDICE A. (CONTINUACIÓN)

Protocolo de control de calidad semanal para las pruebas de dilución aeróbica



January 2000

NCCLS

## References

- 1 Ericsson HM, Sherris JC. Antibiotic sensitivity testing. Report of an international collaborative study. *Acta Pathol Microbiol Scand.* 1971;217(suppl B):1-90.
- 2 NCCLS. *Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria; Approved Standard—Fourth Edition.* NCCLS document M11-A4. NCCLS: Wayne, Pennsylvania;1997.
- 3 Woods GL, Washington JA. Antibacterial susceptibility tests: dilution and disk diffusion methods. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, et al, eds. *Manual of Clinical Microbiology.* 6th ed. Washington DC: American Society for Microbiology; 1995: 1327-1341.
- 4 Steers E, Foltz EL, Graves BS. An inocula replicating apparatus for routine testing of bacterial susceptibility to antibiotics. *Antibiotic Chemother.* 1959;9:307-311.
- 5 NCCLS. *Evaluating Production Lots of Dehydrated Mueller-Hinton Agar; Approved Standard.* NCCLS document M6-A. NCCLS: Wayne, Pennsylvania; 1996.
- 6 Jones RN, Gavan TL, Thornberry C, et al. Standardization of disk diffusion and agar dilution susceptibility tests for *Neisseria gonorrhoeae*: Interpretive criteria and quality control guidelines for ceftriaxone, penicillin, spectinomycin, and tetracycline. *J Clin Microbiol.* 1989;27:2758-2766.
- 7 Surprenant AM, Preston DA. Effect of refrigerated storage on cefaclor in Mueller-Hinton agar. *J Clin Microbiol.* 1985;21:133-134.
- 8 Jorgensen JH, Redding JS, Maher LA, Howell AW. Improved medium for antimicrobial susceptibility testing of *Haemophilus influenzae*. *J Clin Microbiol.* 1987; 25:2105-2113.
- 9 Barry AL, Jones RN, Gavan TL. Evaluation of the Micro-Media System for quantitative antimicrobial drug susceptibility testing. *Antimicrob Agents Chemother.* 1978;13: 61-69.
- 10 Thornberry C, McDougal LK. Successful use of broth microdilution in susceptibility tests for methicillin-resistant (heteroresistant) staphylococci. *J Clin Microbiol.* 1983; 18:1084-1091.
- 11 Schwalbe RS, Stapleton JT, and Gilligan PH. Emergence of vancomycin resistance in coagulase-negative staphylococci. *N Engl J Med.* 1987;316:927-931.
- 12 Kremery V Jr., Trupl J, Drozna L, Kukuckova E, and Oravcova E. Nosocomial bacteremia due to vancomycin-resistant *Staphylococcus epidermidis* in four patients with cancer, neutropenia, and previous treatment with vancomycin. *Eur J Clin Microbiol Inf Dis.* 1996;115:259-261.
- 13 Hiramatsu K, Hanaki H, Ino T, Yabuta K, Oguri T, Tenover FC. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. *J Antimicrob Chemother.* 1997;40:135-136.
- 14 Centers for Disease Control and Prevention. Update: *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin - United States. *Morbidity Mortal Weekly Rep.* 1997;46:813-815.
- 15 Tenover FC, Lancaster MV, Hill BC, Steward CD, Stocker SA, Hancock GA, O'Hara CM, Clark NC, Hiramatsu K. Characterization of staphylococci with reduced susceptibility to vancomycin and other glycopeptides. *J Clin Microbiol.* 1998;36:1020-1027.
- 16 Murray BE. The life and times of the Enterococcus. *Clin Microbiol Rev.* 1990;3: 46-65.
- 17 Torres C, Tenolio C, Lantero M, Gastáñares M, Baquero F. High-level penicillin resistance and penicillin-gentamicin synergy in *Enterococcus faecium*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 1993;37:2427-2431.

**References (Continued)**

Murray BE. Vancomycin-resistant enterococci. *American Journal of Medicine*. 1997; 102:284-293.

Jacoby GA, Medeiros AA. More extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*. 1991;35:1697-1704.

Swenson JM, Hindler JA, Peterson LR. Special tests for detecting antibacterial resistance. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, et al, eds. *Manual of Clinical Microbiology*. 6th ed. Washington DC: American Society for Microbiology; 1995:1356-1367.

Doern GV, Tubert TA. Detection of  $\beta$ -lactamase activity among clinical isolates of *Branhamella catarrhalis* with six different  $\beta$ -lactamase assays. *J Clin Microbiol*. 1987; 25:1380-1383.

<sup>22</sup> NCCLS. *Development of In Vitro Testing Criteria and Quality Control Parameters; Tentative Guideline—Third Edition*. NCCLS document M23-T3. NCCLS: Wayne, Pennsylvania; 1995.

<sup>23</sup> NCCLS. *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests—Sixth Edition; Approved Standard*. NCCLS document M2-A6 (ISBN 1-56238-308-6). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087, 1997.

<sup>24</sup> Barry AL, Braun LE. Reader error in determining minimal inhibitory concentrations with microdilution susceptibility test panels. *J Clin Microbiol*. 1981;3:228-230.

## RESUMEN GENERAL DE RECOMENDACIONES DEL NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (NCCLS)

Alejandra Corso

El comité del epígrafe, constituido por prestigiosos profesionales de los Estados Unidos de Norte América, produce anualmente la actualización de una serie de recomendaciones referidas a las condiciones metodológicas, indicaciones e interpretación de las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos.

Cada corrección o agregado se indica en las tablas con la escritura en negrita y se considera tentativa por un año; durante ese periodo se pone a consideración general de los microbiólogos y después de analizar las objeciones internacionales se incorporan las conclusiones definitivas.

Estas pautas generales tienen amplia difusión mundial y las sociedades de microbiología de varias naciones suelen realizar las correcciones o adaptaciones locales necesarias, pero el trabajo de este grupo continúa siendo el más completo y detallado que se dispone sobre el tema.

El presente es un resumen de las recomendaciones generales y novedades más relevantes introducidas en las últimas ediciones de los documentos M2 (test de difusión) y M7 (CIM) del NCCLS. Este material no pretende reemplazar los documentos, ni tablas originales.

### STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE :

- Los aislamientos de *S. pneumoniae* con diámetro de zona  $\geq 20$  mm. con el disco de oxacilina son sensibles a penicilina y pueden ser considerados sensibles a ampicilina, amoxicilina, amoxicilina/clavulánico, ampicilina/sulbactam, cefaclor, cefepime, cefetamet, cefixima, cefotaxima, cefprozil, ceftibutem, ceftriaxona, cefuroxima, cefpodoxima, ceftizoxima, imipenem, y loracarbef para las indicaciones aprobadas en cada caso y esas drogas no requieren ser ensayadas.
- Zonas de inhibición  $\leq 19$  mm obtenidas con el disco de oxacilina de 1  $\mu\text{g}$  corresponden a cepas resistentes, intermedias y, ocasionalmente, a cepas sensibles a penicilina. Corresponde en estos casos determinar la CIM a penicilina, cefotaxima o ceftriaxona y meropenem. En el caso de obtener un resultado de CIM intermedio (0.12 -1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) o resistente ( $\geq 2$   $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) a penicilina, se deberían informar las CIMs a cefotaxima o ceftriaxona y meropenem.
- En pacientes con infecciones de riesgo de vida (meningitis y bacteriemias) debería determinarse de rutina la CIM a penicilina, cefotaxima o ceftriaxona y meropenem. En estos casos también debería determinarse la sensibilidad a vancomicina, por el método de difusión o dilución.
- No existen aún criterios apropiados de interpretación para el ensayo por difusión de la sensibilidad de algunos antimicrobianos útiles para el tratamiento de *Streptococcus pneumoniae* como amoxicilina, ampicilina, cefuroxima, cefepime, cefotaxima, ceftriaxona, imipenem y meropenem. La actividad *in vitro* de estos agentes debe establecerse mediante la determinación cuantitativa de la CIM.
- La sensibilidad y la resistencia a azitromicina, claritromicina y diritromicina pueden ser predichas por los resultados observados con eritromicina. Los macrólidos no deben ser rutinariamente informados en aislamientos del tracto urinario.

- Los aislamientos sensibles a ofloxacina pueden ser considerados también sensibles a levofloxacina.

### STREPTOCOCCUS SPP :

- Se han establecido pautas para la interpretación de las pruebas de sensibilidad por método de difusión y dilución para *Streptococcus β-hemolítico*, *S. pneumoniae* y *S. Grupo viridans*; en el cuadro siguiente se muestran en cada caso las antimicrobianos estandarizadas hasta la fecha.

DROGA	<i>Streptococcus β-hemolítico</i>	<i>S.pneumoniae</i>	<i>S. viridans</i>
Ampicilina	Difusión + Dilución	NO	Dilución
Amoxicilina	NO	Dilución	NO
Amoxicilina/clav.	NO	Dilución	NO
Azitromicina	Difusión + Dilución	Difusión + Dilución	Difusión + Dilución
Cefepime	NO	Dilución	NO
Cefotaxima	Difusión + Dilución	Dilución	Difusión + Dilución
Ceftriaxona	Difusión + Dilución	Dilución	Difusión + Dilución
Cefuroxima	NO	Dilución	NO
Cloranfenicol	Difusión + Dilución	Difusión + Dilución	Difusión + Dilución
Claritromicina	Difusión + Dilución	Difusión + Dilución	Difusión + Dilución
Clindamicina	Difusión + Dilución	Difusión + Dilución	Difusión + Dilución
Eritromicina	Difusión + Dilución	Difusión + Dilución	Difusión + Dilución
Imipenem	NO	Dilución	NO
Ofloxacina	Difusión + Dilución	Difusión + Dilución	NO
Levofloxacina	Difusión + Dilución	Difusión + Dilución	Difusión + Dilución
Penicilina	Difusión + Dilución	Difusión(OXA1ug) Dilución	Dilución
Rifampicina	NO	Difusión + Dilución	NO
Tetraciclina	Difusión + Dilución	Difusión + Dilución	Difusión + Dilución
Trimetop./Sulfam.	NO	Difusión + Dilución	NO
Vancomicina	Difusión + Dilución	Difusión + Dilución	Difusión + Dilución
Quinup./Dalfopristín	Dilución (sólo para S. grupo A y B)	Difusión + Dilución	NO
Meropenem	NO	Dilución	NO
Trovafloxacina	Difusión + Dilución	Difusión + Dilución	Difusión + Dilución
Cefaclor	NO	Dilución	NO
Cefprozil	NO	Dilución	NO

- Los puntos de corte para la determinación de la concentración inhibitoria mínima están referidos a pruebas realizadas por microdilución usando caldo Mueller Hinton suplementado con cationes calcio y magnesio y 5% de sangre lisada de caballo (sin CO<sub>2</sub>) y con una incubación de 20 a 24 horas.
- A pesar de la falta de criterios de interpretación para la prueba de difusión por discos para algunos antibióticos β-lactámicos frente a *S. pneumoniae*, se ha designado a la cepa *S. pneumoniae* ATCC® 49619 para el control de calidad de la determinación de la sensibilidad por difusión en aislamientos de *Streptococcus spp* .
- Frente a aislamientos de *S. viridans* provenientes de sitios normalmente estériles como líquido cefalorraquídeo, sangre, hueso, etc., debe determinarse la CIM a penicilina. La determinación de la sensibilidad a esta droga no debe realizarse por método de difusión con discos.

- Aislamientos de *Streptococcus* spp (no neumococo) sensibles a la penicilina pueden ser considerados sensibles a ampicilina, amoxicilina, amoxicilina/clavulánico, ampicilina/sulbactam, cefaclor, cefazolin, cefdinir, cefepime, cefotaxima, ceftibuten (estreptococos Grupo A solamente), cefprozil, ceftriaxona, cefuroxima, cefpodoxima, ceftizoxima, cefalotina, cefapirina, cefradina, imipenem, meropenem y loracarbef para las indicaciones aprobadas en cada caso y esas drogas no requieren ser ensayadas.
- Aislamientos de *Streptococcus* spp (no neumococo) con sensibilidad intermedia a penicilina o ampicilina pueden requerir una terapia combinada con aminoglucósidos para asegurar actividad bactericida.

#### HAEMOPHYLUS SPP.

- Para el método de difusión con discos, el tiempo de incubación es de 16-18 horas a 35°C, con CO<sub>2</sub>. Para microdilución la incubación es de 20-24 horas y sin CO<sub>2</sub>.
- Las pautas para la interpretación de las pruebas de sensibilidad por métodos de difusión con discos se aplicarán únicamente cuando se usa el medio HTM: Agar Müller - Hinton, NAD 15mg/l, hematina bovina 15mg/l y extracto de levadura 5g/l , pH 7,2-7,4. La hematina, disuelta en NaOH 0,01N, con calor y agitación, se agrega al agar Müller - Hinton suplementado con extracto de levadura. Después de autoclavar, enfriar y añadir la solución acuosa de NAD, esterilizada por filtración.
- Los resultados de la pruebas de sensibilidad a ampicilina podrían usarse para predecir la actividad a amoxicilina. La mayoría de los aislamientos de *H. influenzae* resistentes a ampicilina o amoxicilina producen  $\beta$  lactamasas tipo TEM y la actividad de estas drogas puede predecirse por la detección de estas enzimas por un test rápido (nitrocefín).
- Para aislamientos provenientes de LCR o sangre de pacientes con riesgo de vida (por ej. meningitis, bacteremia, epiglotitis, celulitis facial) solo debería informarse la sensibilidad a ampicilina, una cefalosporina de tercera generación, cloranfenicol y meropenem. Los resultados obtenidos con agentes administrables por vía oral, solo deberían informarse en aquellos aislamientos provenientes de infecciones no complicadas (por ejemplo: otitis media, sinusitis e infecciones broncopulmonares).
- Amoxicilina/clavulánico, azitromicina, claritromicina, cefaclor, cefprozil, loracarbef, cefdinir, cefixima, cefpodoxima, y cefuroxima axetil son antibióticos orales que podrían usarse como terapia empírica para de infecciones del tracto respiratorio.
- Aquellos que aislamientos resistentes a ampicilina no productores de  $\beta$ -lactamasas (muy inusuales) deberán ser considerados resistentes a amoxicilina/clavulánico, ampicilina/sulbactam, cefamandol, cefetamet, cefaclor, cefonicid, cefprozil, cefuroxima y loracarbef y piperacilina/tazobactam sin tener en cuenta la aparente sensibilidad “in vitro” de algunas cepas a estas drogas.
- Para las siguientes drogas no se han detectado aislamientos resistentes (y por lo tanto, sólo se han establecido límites para la categoría "Sensible"): azitromicina, aztreonam, cefepime, cefixime, cefotaxima, cefpodoxima, cefdinir, ceftacídima, ceftibutem, ceftriaxona, ceftizoxima, ciprofloxacina, ofloxacina, fleroxacina, levofloxacina, trovafloxacina, imipenem y meropenem. Aislamientos con resultados que sugieran la presencia de algún mecanismo de resistencia a estas drogas deberán ser remitidos a un laboratorio de referencia para su estudio posterior.

**N. MENINGITIDIS :**

- El medio recomendado para la determinación de la sensibilidad por método de dilución es : caldo Mueller Hinton suplementado con cationes y 2-5% de sangre lisada de caballo o agar Mueller Hinton con 5% de sangre de carnero. La incubación será en atmósfera de CO<sub>2</sub> por 24 hs . Cuando se ensayen sulfonamidas deberá usarse sangre lisada de caballo.

**STAPHYLOCOCCUS SPP**

- Para *S.aureus*, una CIM a penicilina  $\leq 0,03\mu\text{g/ml}$  usualmente implica ausencia de  $\beta$  lactamasa. CIMs  $\geq 0,25 \mu\text{g/ml}$  son indicativas de resistencia. Cuando se obtienen valores intermedios, debería realizarse un ensayo de inducción (con OXA) para descartar la presencia de la enzima.
- La detección precisa de  $\beta$ -lactamasas en este género podría requerir la inducción de la enzima y la incubación por más de una hora de los ensayos basados en Nitrocefín.
- Los aislamientos de *Staphylococcus aureus* resistentes a penicilina pero sensibles a oxacilina son resistentes a las  $\beta$ -lactámicos lábiles a las  $\beta$ -lactamasas estafilococcicas (ampicilina, amoxicilina, ticarcilina, piperacilina, mezlocilina, carbenicilina).
- La detección de metilino resistencia en estafilococos ha representado un desafío para el laboratorio clínico. La introducción de métodos genéticos dirigidos a confirmar la presencia del gen *mecA* ha permitido optimizar las condiciones metodológicas de las pruebas de laboratorio, por constituirse en un claro “gold standard” para la determinación de la metilino resistencia.
- La detección de metilino resistencia en *Staphylococcus coagulasa negativa* (SCN) mediante la utilización de las metodologías vigentes (difusión por discos, CIM y prueba de “screening”) ha mostrado una baja correlación con los resultados de los métodos moleculares. Por lo tanto, a partir del año 1999 se han propuesto para SCN cambios en los puntos de corte para las pruebas de difusión y dilución con oxacilina y no se recomienda el uso de la prueba de “screening” con esta droga.

**Detección de metilino resistencia en *Staphylococcus spp.***

Droga	Carga del disco	Diámetro de zona (mm)			CIM equivalente ( $\mu\text{g/ml}$ )	
		R	I	S	R	S
Oxacilina Frente a <i>S. aureus</i>	1 $\mu\text{g}$	$\leq 10$	11-12	$\geq 13$	$\geq 4$	$\leq 2$
Oxacilina Frente a <i>S. coag. neg.</i>	1 $\mu\text{g}$	$\leq 17$	-	$\geq 18$	$\geq 0.5$	$\leq 0.25$

- Los aislamientos resistentes a oxacilina deberán considerarse resistentes a todos los antibióticos disponibles en el mercado, incluyendo su asociación con inhibidores de  $\beta$  lactamasas e imipenem, independientemente de los resultados *in vitro*. La mayoría de los casos documentados de resistencia a oxacilina han respondido pobremente a la terapia con  $\beta$  lactámicos y por otra parte, aún no se han presentado datos clínicos convincentes que documenten la eficacia clínica de estos agentes. En conclusión, la actividad a los antibióticos  $\beta$  lactámicos puede deducirse con el uso de sólo dos drogas: penicilina y oxacilina.
- Con aquellos *S. aureus* que presenten diámetros de zona correspondientes a la categoría de "intermedio" con el disco de oxacilina, deberá repetirse el ensayo o realizarse el "test de screening".

- La concentración inhibitoria mínima de oxacilina se determinara con caldo Müeller Hinton suplementado con calcio y magnesio (o agar Müeller Hinton) con el agregado de 2%p/v de NaCl. La incubación se realiza a 30-35°C (no 37°C) por 24 horas.
- El "test de screening" para *S. aureus*, se realizará en agar Müeller Hinton, con el agregado de 4% de NaCl p/v y 6 µg/ml de oxacilina. La incubación, será de 24 horas a 30-35°C (no 37°C).
- Se han incorporado dos cepas como control de calidad del “Test de screening” de oxacilina 6µg /ml : *S.aureus* ATCC® 43300 (control positivo) y *S. aureus* ATCC® 29213 (control negativo).

## ENTEROCOCCUS SPP

- No debería ensayarse ni informarse la actividad de antimicrobianos como cefalosporinas, aminoglucósidos (excepto con discos de alta carga para el "screening" de alto nivel de resistencia), clindamicina y trimetoprima/sulfametoxazol frente a *Enterococcus spp* porque pueden observarse resultados peligrosamente erróneos.
- La sensibilidad a penicilina puede predecir la sensibilidad a ampicilina, piperacilina y su asociación con inhibidores de β-lactamasas en aislamientos no productores de β- lactamasas.
- Para el tratamiento de infecciones serias por este microorganismo, deberán usarse altas dosis de penicilina o ampicilina a pesar de que las zonas de inhibición correspondan a la categoría de "susceptible". En el caso particular de endocarditis enterocócica se requiere terapia combinada de altas dosis de penicilina o ampicilina o de vancomicina o teicoplanina más gentamicina o estreptomina para asegurar la actividad bactericida.  
Ambas recomendaciones deberían estar incluidas en el informe del laboratorio.
- La sinergia entre penicilina, ampicilina o vancomicina con aminoglucósidos puede ser predicha usando el "test de screening" para la detección de altos niveles de resistencia a aminoglucósidos.
- Para la detección de altos niveles de resistencia a aminoglucósidos se debe inocular en "spot" 10 µl de una suspensión equivalente al 0,5 de Mc Farland sobre una placa de agar BHI con 500mg/l de gentamicina o 2000 mg/l de estreptomina, con una incubación a 35°C durante 24 - 48 horas. El crecimiento de más de una colonia se considera resistencia de alto nivel y se toma como control positivo a *Enterococcus faecalis* ATCC® 51299 y como control negativo a *Enterococcus faecalis* ATCC® 29212.
- En caso de utilizar el método de "screening" en caldo BHI, deberán utilizarse 500 µg/ml de gentamicina y 1000 µg/ml de estreptomina, con una incubación a 35°C durante 24-48 horas.
- Para el "test de screening" por difusión se utiliza el disco de gentamicina 120 µg y estreptomina 300 µg. Un resultado entre 7 a 9mm deberá re-evaluarse por método de "screening" en agar o caldo BHI.
- Como "screening" para la determinación de resistencia a vancomicina se siembra un inóculo en iguales condiciones que las descritas anteriormente, en una placa de agar BHI con 6mg/l de vancomicina, incubando a 35° C, durante 24 horas. El crecimiento de más de una colonia se considera resistencia. Se toma como control positivo: *Enterococcus faecalis* ATCC® 51299 y como control negativo: *Enterococcus faecalis* ATCC® 29212.
- Por método de difusión, la sensibilidad a vancomicina se debe evaluar después de incubar por 24 horas completas y examinar, usando luz transmitida, la presencia de un velo o cualquier desarrollo dentro de la zona de inhibición, indicativos de resistencia. En caso de observarse una zona de inhibición entre 15 y 16 mm (categoría Intermedia), el resultado deberá confirmarse mediante un método de dilución.

- Debido a las escasas alternativas terapéuticas para el tratamiento de las infecciones causadas por *Enterococcus* spp. resistentes a vancomicina (VRE), se recomienda ensayar la actividad de cloranfenicol, eritromicina, tetraciclinas y rifampicina. Tetraciclina es la droga representativa de todas las tetraciclinas, y los resultados pueden ser aplicados a doxiciclina y minociclina. Doxiciclina y minociclina podrían ser probadas en lugar de, o en adición a tetraciclina. Sin embargo, ciertos organismos podrían ser más sensibles a doxiciclina y minociclina que a tetraciclina. Por lo que deberían evaluarse en forma independiente. No debería informarse la sensibilidad a eritromicina en aquellos aislamientos provenientes del tracto urinario.
- Frente a un resultado positivo de la prueba de “screening” de vancomicina, determinar la CIM para dicha droga. En caso de observarse valores correspondientes a sensibilidad intermedia, realizar estudios de movilidad, prueba de  $\alpha$ -metilglucósido y producción de pigmentos para distinguir entre especies con resistencia adquirida (VanA o VanB) de las que presentan resistencia intrínseca, como *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* o *E. flavescens*. Estas especies presentan CIMs de vancomicina entre 8 y 16  $\mu\text{g/ml}$  (intermedias) y difieren de los demás VRE en los requerimientos de medidas de control epidemiológico.
- Las pruebas de sensibilidad por difusión o dilución a fosfomicina son sólo aplicables a *E. faecalis*. Los discos de fosfomicina (200  $\mu\text{g}$ ) deben contener además 50  $\mu\text{g}$  de glucosa-6-fosfato. El método aprobado para la determinación de las concentraciones inhibitorias mínimas es el de dilución en agar con el agregado de 25  $\mu\text{g/ml}$  de glucosa-6-fosfato.
- Para aislamientos de sangre y líquido cefalorraquídeo, es recomendable realizar un ensayo de  $\beta$  lactamasas con un inóculo  $\geq$  a  $10^7$  UFC/ml.
- La detección de  $\beta$ -lactamasas no es sencilla por los métodos convencionales y es preferible una prueba basada en una cefalosporina cromogénica.

#### **BETALACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO (BLEE) EN *E. COLI* , *K. PNEUMONIAE* Y *K. OXYTOCA*:**

- La resistencia a cefalosporinas de tercera generación generalmente puede ser fácilmente detectada cuando está mediada por cefalosporinasas cromosómicas desreprimidas. Sin embargo, las BLEE pueden conferir bajos niveles de resistencia, complicando su detección en el laboratorio.
- Las BLEE son enzimas bacterianas que pueden conferir resistencia a cefotaxima, ceftazidima, aztreonam, penicilinas de espectro extendido y antibióticos  $\beta$ -lactámicos estructuralmente relacionados, en aislamientos clínicos de *Klebsiella pneumoniae*, *K. oxytoca*, *E. coli* y otros géneros de la familia Enterobacteriaceae, que son usualmente sensibles a  $\beta$ -lactámicos de espectro extendido.
- Estas enzimas han demostrado ser clínicamente importantes, ya que varios autores demostraron falla de tratamiento con cefalosporinas de tercera generación en infecciones serias causadas por microorganismos productores de BLEE.
- Algunas BLEE confieren altos niveles de resistencia a estos antimicrobianos y son detectadas fácilmente por método de difusión. Otras, sin embargo, muestran bajo nivel de resistencia y podrían ser reconocidas como intermedias o resistentes sólo con alguno de los siguientes agentes: cefpodoxima, ceftazidima, aztreonam, cefotaxima, ceftriaxona, o ceftizoxima. Cepas productoras de BLEE suelen ser también resistentes a otros antimicrobianos, tales como aminoglucósidos y trimetoprima/sulfametoxazol.
- Este tipo de aislamientos pueden no superar los puntos de corte de resistencia establecidos por el NCCLS, a pesar de ser clínicamente resistentes a la terapia  $\beta$ -lactámica.

- El informe del laboratorio debería indicar que las cepas productoras de BLEE podrían ser clínicamente resistentes a todas las cefalosporinas y a aztreonam.
- Aislamientos clínicos de *Klebsiella spp* y *E. coli* con zonas de inhibición disminuidas con los discos de cefpodoxima, ceftazidima, aztreonam, cefotaxima, ceftriaxona deben ser considerados como probables portadores de BLEE.
- El incremento de las zonas de inhibición en presencia de ácido clavulánico es indicativo de la presencia de una BLEE. Aún esta en desarrollo un método óptimo para la detección de este tipo de enzimas.
- La Tabla Nro. 2A, M2-A7, señala que estudios preliminares indican que cepas de *E.coli* *K. pneumoniae* y *K. oxytoca* portadoras de BLEE pueden ser detectadas usando los siguientes antimicrobianos y “breakpoints” : cefpodoxima ( $\leq 22$  mm), aztreonam ( $\leq 27$  mm), ceftazidima ( $\leq 22$  mm), cefotaxima ( $\leq 27$ mm) o ceftriaxona ( $\leq 25$  mm).  
(Nota de la edición: recordar que estas recomendaciones se ajustan a las enzimas detectadas en EEUU y Europa. En nuestro medio, la BLEE CTX-M2 es fundamentalmente una cefotaximasa).
- La Tabla Nro. 2A, M7-A5 indica que aislamientos de *E. coli*, *K. pneumoniae* y *K. oxytoca* con CIMs incrementadas ( $\geq 2$   $\mu\text{g/ml}$ ) a cefpodoxima, ceftazidima, cefotaxima, ceftriaxona aztreonam deberían considerarse probables portadoras de BLEE.

#### VIBRIO CHOLERAE :

- Los resultados de las pruebas por difusión con discos para ampicilina, sulfisoxazol, tetraciclina y trimetoprima/sulfametoxazol correlacionan bien con los resultados determinados por microdilución en caldo ; sin embargo, los puntos de corte actuales para cloranfenicol clasifican erróneamente muchos organismos (alto porcentaje de errores menores) y debería ser usado con precaución. La prueba de difusión por discos no debe usarse para doxiciclina y eritromicina porque hay una pobre correlación con los resultados de CIM. Sin embargo, el disco de tetraciclina puede ser usado para predecir adecuadamente la susceptibilidad de estos aislamientos a doxiciclina.

#### MORGANELLA SPP :

- No debería utilizarse el método de difusión para determinar la sensibilidad a cefixima, cefpodoxima y cefetamet frente a este microorganismo.

#### PROVIDENCIA SPP

- Debido a que se han detectado cepas de *Providencia spp.* con resultados de falsa susceptibilidad con el disco de cefprozil, no debería probarse ni informarse la susceptibilidad a esta droga por método de difusión.

#### PSEUDOMONAS AERUGINOSA

- No deberán ensayarse ni informarse drogas tales como: ticarcilina/clavulánico, trimetoprima/sulfametoxazol, tetraciclina y cloranfenicol. Estas drogas, sin embargo, pueden estar indicadas para *Pseudomonas spp* (no *P. aeruginosa*), *Stenotrophomonas malthophilia* y *Acinetobacter spp.*

- Pacientes granulocitopénicos o con infecciones serias podrían ser tratados con dosis máximas de penicilinas antiseudomonales (carboxipenicilinas o acilaminopenicilinas) o ceftazidima, en combinación con un aminoglucósido.

### **ACINETOBACTER SPP**

- Debe recordarse la actividad de ampicilina/sulbactam frente a estos microorganismos, particularmente debida a la actividad antimicrobiana de sulbactama *per se*.

### **MORAXELLA CATARRHALIS**

- Para determinar la sensibilidad a penicilina, ampicilina y amoxicilina es suficiente la realización de un ensayo de  $\beta$ -lactamasa. Se recomienda usar el test de la cefalosporina cromogénica (nitrocefín).

### **ANTIMICROBIANOS CON RECOMENDACIONES PARTICULARES**

#### **1. Cefalotina:**

- Pueden ser usada como representante cefalexina, cefaclor, cefapirina, cefradina, cefadroxil.
- Cefazolina, cefuroxima, cefpodoxima, cefprozil y loracarbef podrían ser probadas individualmente dado que pueden ser activas cuando cefalotina no.

#### **2. Ceftibutem y Norfloxacin:**

- Los puntos de corte descriptos para ceftibutem y norfloxacin solo pueden aplicarse para microorganismos aislados del tracto urinario (de igual modo que ácido nalidíxico, nitrofurantoina, sulfonamidas y trimetoprima).

#### **3. Tetraciclinas:**

- Algunos aislamientos de *S. aureus* y bacilos Gram. negativos no fermentadores, por ejemplo *Acinetobacter spp* resistentes a tetraciclina pueden ser sensibles a minociclina y doxiciclina. Por lo tanto, estas últimas no deberían usarse para predecir susceptibilidad a tetraciclina.

#### **4. Sulfonamidas:**

- El disco de sulfisoxazol puede ser usado como representante de todas las sulfonamidas. Los medios conteniendo sangre (a excepción de la sangre lisada de caballo) no son apropiados para la determinación de la sensibilidad a sulfonamidas y trimetoprima. Debería controlarse que el agar Müeller Hinton no contenga exceso de timidina.

#### **5. Trimetoprima/sulfametoxazol:**

- Esta droga puede ser usada para ciertas infecciones sistémicas. Según los puntos de corte, un microorganismo puede ser considerado sensible con CIMs menores o iguales a 2/38  $\mu\text{g/ml}$  pero se han observado mejores respuestas clínicas para cepas con CIMs menores o iguales a 0.5/9.5  $\mu\text{g/ml}$ .

## 6. Rifampicina :

- Siempre que se informe la sensibilidad de esta droga los laboratorios deberían indicar que esta droga no debe administrarse sola.

### MAS CEPAS DE REFERENCIA PARA CONTROL DE CALIDAD

Además de las cepas 4 de colección ATCC® utilizadas usualmente (*E. coli* ATCC® 25922, *S.aureus* ATCC® 25923, *P. aeruginosa* ATCC® 27853 y *E. coli* ATCC® 35218), deben considerarse los siguientes microorganismos de referencia:

***Haemophilus influenzae* ATCC® 49247** : control de la mayoría del los antimicrobianos.

***Haemophilus influenzae* ATCC® 49766** : control de algunas cefalosporinas.

***Haemophilus influenzae* ATCC® 10211** : control de calidad del medio HTM.

***Streptococcus pneumoniae* ATCC® 49619**

***Neisseria gonorrhoeae* ATCC® 49226**

***Enterococcus faecalis* ATCC® 51299** : control positivo de resistencia de alto nivel de AG y VAN

***Enterococcus faecalis* ATCC® 29212** : control negativo de resistencia de alto nivel de AG y VAN

***Staphylococcus aureus* ATCC® 43300** : control positivo de “test de screening” OXA 6 µg

***Staphylococcus aureus* ATCC® 29213** : control negativo de “test de screening” OXA 6 µg

***Klebsiella pneumoniae* ATCC® 700603**: control positivo de “test de screening” para β-lactamasas de espectro extendido.

**CONDICIONES METODOLÓGICAS PARA LA DETECCIÓN Y CONFIRMACIÓN DE LA PRESENCIA DE BLEE EN *E. COLI*, *K. PNEUMONIAE* Y *K.OXYTOCA***

**1) MÉTODO DE DIFUSIÓN :**

	<b>Prueba de Screening</b>	<b>Confirmación Fenotípica</b>
<b>Medio utilizado</b>	Agar Müller Hinton	Agar Müller Hinton
<b>Discos (carga)</b>	Cefpodoxima (10 µg) ó Ceftazidima (30 µg) ó Aztreonam (30 µg) ó Cefotaxima (30 µg) ó Ceftriaxona (30 µg)  (Se puede mejorar la sensibilidad en la detección utilizando más de uno de estos discos. p. ej. ceftazidima y cefotaxima o ceftriaxona)	Ceftazidima (30 µg) Ceftazidima /ác. Clavulánico (30/10 µg) <b>Y</b> Cefotaxima (30 µg) Cefotaxima /ác. Clavulánico (30 /10 µg)  (La prueba de confirmación requiere probar ambas cefalosporinas de tercera generación y su asociación con inhibidores)
<b>Inóculo</b>	Según recomendaciones para la prueba de difusión con discos ( $1 \times 10^8$ UFC/ml).	Según recomendaciones para la prueba de difusión con discos ( $1 \times 10^8$ UFC/ml)
<b>Incubación</b>	35° C; en atmósfera normal	35° C; en atmósfera normal
<b>Tiempo de incubación</b>	16-18 hs	16-18 hs
<b>Interpretación de los resultados</b>	Diámetro (mm) de: Cefpodoxima $\leq 22$ Ceftazidima $\leq 22$ Aztreonam $\leq 27$ Cefotaxima $\leq 27$ Ceftriaxona $\leq 25$  Indica sospecha de presencia de $\beta$ -lactamasa de espectro extendido	Una diferencia $\geq 5$ mm entre el diámetro producido por el disco con ceftazidima + ác. Clavulánico y el de ceftazidima solo o entre el disco de cefotaxima + ác. clavulánico y cefotaxima solo, confirma la presencia de una $\beta$ -lactamasa de espectro extendido. (Por ejemplo, diámetro de: ceftazidima / ác. Clavulánico = 21 mm ceftazidima = 16 mm)
<b>Recomendaciones para el control de calidad del ensayo</b>	Control negativo: <i>E. coli</i> ATCC 25922 (ver rangos aceptables en la tabla correspondiente del NCCLS)  Control positivo: <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603: Cefpodoxima 9 – 16 mm Ceftazidima 10 – 18 mm Aztreonam 9 – 17 mm Cefotaxima 17 – 25 mm Ceftriaxona 16 – 24 mm	Control negativo: <i>E. coli</i> ATCC 25922 = debe observarse un incremento $\leq 2$ mm entre el diámetro producido por el disco de cefalosporina de tercera generación solo y el que contiene ác. clavulánico  Control positivo: <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603: Incremento $\geq 5$ mm en el diámetro de ceftazidima. Incremento $\geq 3$ mm en el diámetro de cefotaxima.

## 2) MÉTODO DE DILUCIÓN

	Prueba de screening	Confirmación fenotípica
<b>Medio utilizado</b>	Caldo Müeller Hinton con ajuste de cationes	Caldo Müeller Hinton con ajuste de cationes
<b>Concentración de antimicrobianos</b>	<p>Cefpodoxima 1 µg/ml ó                      Ceftazidima 1 µg/ml ó                      Aztreonam 1 µg/ml ó                      Cefotaxima 1 µg/ml ó                      Ceftriaxona 1 µg/ml</p> <p>(Se puede mejorar la sensibilidad en la detección utilizando más de uno de estos antimicrobianos. por ej. ceftazidima y cefotaxima o ceftriaxona)</p>	<p>Ceftazidima 0.25-128 µg/ml                      Ceftazidima/ác clav. 0.25/4-128/4 µg/ml</p> <p><b>Y</b></p> <p>Cefotaxima 0.25-64 µg/ml                      Cefotaxima / ác. clav. 0.25/4-64/4 µg/ml</p> <p>(La prueba de confirmación requiere probar ambas cefalosporinas de tercera generación y su asociación con inhibidores)</p>
<b>Inóculo</b>	Según recomendaciones para la prueba de dilución en caldo (5 x 10 <sup>5</sup> UFC/ml).	Según recomendaciones para la prueba de dilución en caldo (5 x 10 <sup>5</sup> UFC/ml)
<b>Condiciones de incubación</b>	35° C; en atmósfera normal	35° C; en atmósfera normal
<b>Tiempo de incubación</b>	16-20 hs	16-20 hs
<b>Interpretación de los resultados</b>	<p>Crecimiento = Indica sospecha de presencia de β-lactamasa de espectro extendido (es decir CIM ≥ 2 µg/ml)</p>	<p>Una disminución ≥ 3 diluciones entre la CIM obtenida con alguna de las cefalosporina de tercera generación sola y la CIM obtenida con la cefalosporina de tercera generación combinada con el inhibidor confirma la presencia de una β-lactamasa de espectro extendido.                      (por ej. CIM de:                      ceftazidima = 8 µg/ml                      ceftazidima / ác. clavulánico = 1 µg/ml)</p>
<b>Recomendaciones para el control de calidad del ensayo</b>	<p>Control negativo:  <i>E. coli</i> ATCC 25922 = no crecimiento (ver rangos aceptables en la tabla correspondiente del NCCLS)</p> <p>Control positivo:  <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603 = Crecimiento (es decir CIM ≥ 2 µg/ml)</p>	<p><i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603 = disminución ≥ 3 diluciones entre la CIM obtenida con la cefalosporina de tercera generación sola y la CIM obtenida con la cefalosporina de tercera generación combinada con el inhibidor.</p>

## NOVEDADES DEL NCCLS 2001

Alejandra Corso

Servicio Antimicrobianos

Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas. ANLIS “Dr. C. G. Malbrán”

Se describe aquí un breve resumen de las novedades mas relevantes publicadas en enero de **2001** en el documento **M100-S11** del **National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS): Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Eleventh Informational Supplement**. El documento **M100-S11** provee las tablas actualizadas correspondientes a los documentos **M2-A7** (Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Test; Approved Standard - Seventh Edition) y **M7-A5** (Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Test for Bacteria that Grow Aerobically; Approved Standard - Fifth Edition).

Se ha indicado el número de tabla en donde se pueden encontrar las nuevas recomendaciones y si estas son aplicables al **método de difusión** por discos (**M2**) y/o al **método de dilución** (**M7**). Las modificaciones o incorporaciones se han resaltado en “*letra itálica*”.

Algunas de dichas recomendaciones están relacionadas a patógenos con perfiles de resistencia que representan un desafío terapéutico o que muestran con dificultades importantes para la detección de algún mecanismo de resistencia. Este es el listado de microorganismos en los cuales se han observado los cambios mas relevantes de este año:

- ❖ ***P. aeruginosa***
- ❖ ***Staphylococcus saprophyticus***
- ❖ ***Staphylococcus aureus***
- ❖ ***Haemophilus spp.***
- ❖ ***S. viridans* y  $\beta$ -hemolíticos y**
- ❖ ***Enterococcus spp.***

### # ***P. aeruginosa***

**Tabla 2B**, *P. aeruginosa* y *Acinetobacter spp.* (**M2**) y *P. aeruginosa* y otras bacterias no *Enterobacteriaceae* (**M7**):

- *La prueba de sensibilidad a P. aeruginosa aisladas de pacientes fibroquísticos puede ser adecuadamente determinada por el método de difusión o dilución, pero requieren 24hs. de incubación.*
- *Se han incorporado puntos de corte para gatifloxacina, los cuales son solo aplicables a aislamientos provenientes de muestras de orina.*

### # *S. saprophyticus*

#### **Tabla 2C, *Staphylococcus* spp. (M2-M7):**

- Se aconseja no realizar las pruebas de sensibilidad (tanto difusión como CIM) de rutina en aislamientos de *S. saprophyticus* provenientes de muestras de orina, dado que estas infecciones responden a las concentraciones alcanzadas de los agentes antimicrobianos comúnmente usados para el tratamiento de infecciones urinarias no complicadas (p.ej nitrofurantoína, trimetoproma/sulfametoxazol, o fluorquinolonas).
- Tampoco se recomienda probar oxacilina en *S. saprophyticus* dado que esta especie podría parecer como resistente de acuerdo al punto de corte para *S. coagulasa* negativa y ser *mecA* negativo.

### # *S. aureus*:

#### **Tabla 2C, *Staphylococcus* spp. (M7):**

- En el agar "screening" Oxacilina (6 µg/ml) + 4 % NaCl se ha modificado el volumen de siembra para el test de screening de oxacilina:

**Medio:** MHA + NaCl (4% p/v; 0.68 mol/l)

**Concentración de antibiótico:** 6 µg/ml de oxacilina.

**Inóculo:** 0.5 Mc. Farland preparado a partir de suspensión directa de colonias.

Inocular **1 µl** de la suspensión del inóculo 0.5 Mc. Farland (usando un anza calibrada o pipeta automática) en la placa y sembrar en spot en un área de 10-15 mm de diámetro. Alternativamente, usando un hisopo sumergido en la suspensión y escurrido, sembrar en spot en un área similar o estriar en un cuadrante de una placa.

**Incubación:** 35 °C, por 24 hs.

**Interpretación de resultados:** > 1 colonia= resistente

Examinar cuidadosamente con luz transmitida la presencia de > 1 colonia o crecimiento tenue.

#### **Cepas recomendadas para el control de calidad:**

*S. aureus* ATCC29213: Sensible

*S. aureus* ATCC 43300: Resistente

### # *Enterococcus* spp.

#### **Tabla 2D, *Enterococcus* spp. (M2-M7):**

- Se han incorporado puntos de corte para gatifloxacina, los cuales son solo aplicables a aislamientos provenientes de muestras de orina.

### # *Haemophilus* spp.

#### **Tabla 2E, *Haemophilus* spp. (M2-M7):**

- La resistencia a fluorquinolonas en *H. influenzae* es rara, por lo que se recomienda enviar estos aislamientos a un Centro de Referencia para su confirmación.

**# Streptococcus viridans y Streptococcus β-hemolíticos:****Tabla 2H, Streptococcus spp. (NO S. pneumoniae) (M2-M7):**

- En el año 2001 la NCCLS ha separado los puntos de corte para penicilina, ampicilina, cefotaxima, ceftriaxona y cefepime en estreptococos β-hemolíticos y estreptococos del grupo viridans.

A T B	Disco	Estreptococos β-hemolíticos					Estreptococos grupo viridans					Comentarios
		Difusión (mm)			CIM (µg/ml)		Difusión (mm)			CIM (µg/ml)		
		R	I	S	R	S	R	I	S	R	S	
<b>PEN</b>	<b>10U</b>	--	--	≥ 24	--	≤ 0.12	--	--	--	≥ 4	≤ 0.12	(1) (2) (3)
<b>AMP</b>	<b>10 µg</b>	--	--	≥ 24	--	≤ 0.25	--	--	--	≥ 8	≤ 0.25	(1) (2) (3)
<b>CTX</b>	<b>30 µg</b>	--	--	≥ 24	--	≤ 0.5	≤ 25	26-27	≥ 28	≥ 2	≤ 0.5	(4)
<b>CRO</b>	<b>30 µg</b>	--	--	≥ 24	--	≤ 0.5	≤ 24	25-26	≥ 27	≥ 2	≤ 0.5	(4)
<b>FEP</b>	<b>30 µg</b>	--	--	≥ 24	--	≤ 0.5	≤ 21	22-23	≥ 24	≥ 2	≤ 0.5	(5)

PEN: penicilina, AMP: ampicilina, CTX: cefotaxima, CRO: ceftriaxona, FEP: cefepime.

- (1) Los estreptococos que son sensibles a penicilina, pueden ser considerados sensibles a ampicilina, amoxicilina, amoxicilina/clavulánico, ampicilina/sulbactam, cafaclor, cafazolina, cefdinir, cefepime, cefprozil, cefotaxima, ceftibuten (solo para estreptococos Grupo A), ceftriaxona, cefuroxima, cefpodoxima, ceftizoxima, cefalotina, cefapirina, cafradina, imipinem, loracarbef y meropenem; por lo que no sería necesario probar estos agentes.
- (2) Los puntos de corte para penicilina y ampicilina por método de difusión son solo aplicables a estreptococos β-hemolíticos. Se encontró que el método de difusión para antibióticos como penicilina, ampicilina u oxacilina no son apropiados para estreptococos del grupo viridans.
- (3) *No se han detectado aislamientos de estreptococos β-hemolíticos con zonas de inhibición menores a 24 mm con penicilina o ampicilina (o CIMs > 0.12 µg/ml o > 0.25 µg/ml para penicilina o ampicilina respectivamente). Se recomienda enviar a un centro de referencia para su confirmación, cualquier aislamiento con estas características.*
- (4) *No se han detectado aislamientos de estreptococos β-hemolíticos con zonas de inhibición menores a 24 mm con cefotaxima o ceftriaxona (o CIMs > 0.25 µg/ml). Se recomienda enviar a un centro de referencia para su confirmación, cualquier aislamiento con estas características.*
- (5) *No se han detectado aislamientos de estreptococos β-hemolíticos con zonas de inhibición menores a 24 mm con cefepime. Se recomienda enviar a un centro de referencia para su confirmación, cualquier aislamiento con estas características.*

- Los puntos de corte para quinupristin/dalfopristin (M2 y M7) son aplicables solo para *S. pyogenes*.
- Lo puntos de corte para levofloxacin, ofloxacin y gatifloxacin son válidos solo para el informe de estreptococos  $\beta$ -hemolíticos.

#### # Cambios en los rangos de aceptabilidad para algunas cepas de referencia

**Tablas 3 y 3A**, Rangos aceptables de zonas de inhibición (mm) de cepas ATCC para control de calidad del antibiograma **(M2)**:

- i) *E. faecalis* ATCC 29212 y disco de gentamicina 120  $\mu$ g: 16 – 23 mm.
- ii) *E. faecalis* ATCC 29212 y disco de estreptomycin 300  $\mu$ g: 14 –20 mm.
- iii) *S. pneumoniae* ATCC 49619 y disco de oxacilina 1 $\mu$ g: < 12 mm.

El deterioro del disco de oxacilina se puede evaluar mas eficazmente con el *S. aureus* ATCC 25923, el rango aceptable es entre 18 y 24 mm.

- iv) *S. aureus* ATCC 25923 y disco de quinupristín/dalfopristín 15  $\mu$ g: 21 - 28 mm.

#### # Recomendaciones para Quinupristín/dalfopristín

**Tabla 1**, Grupo de antibióticos sugeridos para las pruebas de sensibilidad de organismos no fastidiosos **(M2-M7)**.

- Quinupristín/dalfopristín se debería probar e informar en aquellos aislamientos de:
  - 1) *E. faecium* con resistencia a vancomicina.
  - 2) *S. aureus* metilino sensibles.